

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**ESTUDIO DE LA REGULACION  
TRANSCRIPCIONAL DE ALK1, RECEPTOR TIPO  
DE TGF- $\beta$ , EN LA CÉLULA ENDOTELIAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Eva María Garrido Martín**

Bajo la dirección de los doctores

Carmelo Bernabéu Quirante  
Luisa María Botella Cubells

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-2452-0**

© Eva María Garrido Martín, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE ALK1,  
RECEPTOR TIPO I DE TGF- $\beta$ , EN LA CÉLULA ENDOTELIAL**

Memoria presentada por

**EVA MARÍA GARRIDO MARTÍN**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) bajo la dirección de los Drs.  
D. Carmelo Bernabéu Quirante y D<sup>a</sup>. Luisa María Botella Cubells.



Madrid, 2010

**VºBº DIRECTORES TESIS**

**VºBº DOCTORANDA**

**Dr. Carmelo Bernabéu Quirante  
Dra. Luisa María Botella Cubells**

**Eva María Garrido Martín**



Este trabajo ha sido realizado con cargo a los proyectos de investigación:

SAF2004-01390 del Ministerio de Educación y Ciencia. 2004-2007. *“Estudios sobre endoglina, un correceptor de TGF- $\beta$  implicado en la patología humana”*. Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC. Investigador principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

SAF2007-61827 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional de I+D. 2007-2010. *“Mecanismos moleculares del receptor de TGF- $\beta$  endotelial en la fisiopatología vascular”*. Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC. Investigador principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

Proyecto CIBER (Centro de Investigación Biomédica En Red) de Enfermedades Raras (CIBERER), grupo de investigación U707: *“Patología vascular y receptores endoteliales”*. Investigador principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

Y gracias a las becas obtenidas:

BES2005-7974 del Ministerio de Educación y Ciencia. Dirección General de Investigación. Asociada al proyecto SAF2004-01390.



*“En medio del invierno,  
me pareció que había,  
dentro de mí,  
un invencible verano”*

Albert Camus

D. CARMELO BERNABÉU QUIRANTE, Profesor de Investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Dña. LUISA MARÍA BOTELLA CUBELLS, Científico Titular del Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN

Que Dña. Eva María Garrido Martín, Licenciada en Farmacia y Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el proyecto correspondiente a su Tesis **“Estudio de la regulación transcripcional de ALK1, receptor tipo I de TGF- $\beta$ , en la célula endotelial”**, y que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid.

LOS DIRECTORES,

Fdo:

D. Carmelo Bernabéu Quirante, PhD.

Fdo:

Dña. Luisa María Botella Cubells, PhD.

## ABREVIATURAS

**ACVRL1** - *Activin A receptor type II-like 1*. Nomenclatura del gen.

**ACVRLK1** - *Activin A receptor type II-like kinase 1*. Nomenclatura alternativa del gen.

**ADNc** - Ácido desoxirribonucleico complementario a la hebra de ARN.

**ADNdc** - ADN de doble cadena.

**ALK1** - *Activin receptor-like kinase-1*. Nomenclatura de la proteína.

**AMPc** - Adenosin monofosfato cíclico.

**ARN** - Ácido ribonucleico.

**ARNT** - *Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*.

**bHLH** - Dominio básico hélice-giro-hélice (*Basic Hélix-Loop-Hélix Domain*).

**BNIP/NIP-3** - *Bcl-2/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3*.

**BTD** - Caja *buttonhead*.

**BOEC** - Células endoteliales humanas derivadas de sangre periférica (*Blood outgrowth endothelial cells*).

**BSA** - Albúmina sérica bovina.

**CBP** - Proteína de unión a CRE.

**CBP/p300** - Proteína de unión a CBP.

**CF** - Citometría de flujo.

**ChIP** - Inmunoprecipitación de cromatina.

**CIP** - Fosfatasa intestinal de ternera (*Calf Intestinal Phosphatase*).

**CoCl<sub>2</sub>** - Cloruro de cobalto.

**COS-7** - Línea celular epitelial de riñón de mono inmortalizada.

**C.p.m.** - Cuentas por minuto.

**CRE** - Proteína de unión a AMPc.

**CXCR-4** - Receptor 4 de quimioquinas con motivos C-X-C (dos cisteínas separadas por un aminoácido cualquiera).

**DAB** - *3,3'-diaminobenzidine*.

**Daf1** - Factor acelerador de la desactivación del complemento.

**DAPI** - *4',6-diamidino-2-phenylindole*.

**DBD** - Dominio de unión al ADN.

**DFO** - Desferrioxamina, quelante de Fe<sup>2+</sup> que inhibe las prolil-hidroxilasas.

**DMEM** - *Dulbecco's modified Eagle's Medium*.

**dNTPs** - Desoxinucleótidos trifosfato.

**DTT** - Ditionitroreitol.

**EDTA** - Ácido etilendiaminotetraacético.

**EGF** - Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*).

**EMSA** - Ensayo de movilidad electroforética retardada.

**ENG** - Gen de endoglina.

**eNOS/NOS3** - Óxido nítrico sintasa endotelial

**EPAS** - Factor endotelial tipo PAS. Es HIF-2 $\alpha$ .

**FAM** - 6 carboxi-fluoresceína.

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína.

**GAPDH** - Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

**GM7372** - Línea celular endotelial bovina inmortalizada.

**HDAC1** - Histona deacetilasa 1.

**HEK293T** - Línea celular humana epitelial embrionaria de riñón inmortalizada con antígeno T (*Human embryonic kidney cell line 293T*).

**HeLa** - Línea celular derivada de carcinoma cervical, que toma su nombre de la paciente de la que se obtuvo (Henriqueta Lack).

**HIF** - Factor inducible por hipoxia (*Hypoxia inducible factor*).

**HLA-I** - Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I.

**HLF** - Factor similar a HIF (*HIF-like factor*).

**HRE** - Elemento de respuesta a hipoxia.

**HRF** - Factor relacionado con HIF (*HIF-related factor*).

**HRP** - Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*).

**HMEC-1** - Línea celular inmortalizada humana de endotelio microvascular.

**HUVEC** - Cultivo primario de células endoteliales de vena umbilical humana.

**ID1** - Inhibidor de la diferenciación 1.

**IF** - Inmunofluorescencia.

**IHC** - Inmunohistoquímica.

**IPAS** - Factor inhibidor tipo PAS. Es una variante de procesamiento alternativo de HIF-3 $\alpha$ .

**kDa** - Kilodalton.

**KLF** - *Krüppel Like Factor*.

**K.O.** - Ratón *Knock Out*, es decir, que posee una manipulación génica que conlleva la ausencia o interrupción de un determinado gen.

**MOPS2** - Miembro de la Superfamilia PAS 2.

**NLS** - Secuencia terminal que señala localización nuclear.

**ODD** - Dominio de degradación dependiente de oxígeno.

**ORW2** - Osler-Rendu-Weber tipo 2.

**PAI-1** - Inhibidor del activador del plasminógeno-1.

**PAS** - *Per/ARNT/Sim*.

**Pb** - Pares de bases.

**PBS** - *Phosphate Buffer Saline*.

**PCR** - Reacción en cadena de la polimerasa.

**PECAM-1** - *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*.

**PHD** - Prolinhidroxilasa.

**PVDF** - *Polyvinylidene Fluoride*.

**pVHL** - Von Hippel-Landau ubiquitin-ligasa E3.

**5'RACE** - Amplificación rápida de extremos 5' de ADNc.

**r.p.m.** - Revoluciones por minuto.

**R-Smad** - Smad regulada por receptor.

**RT-PCR** - Retrotranscripción de ARN seguida de reacción en cadena de la polimerasa del ADNc.

**SAM** - S-adenosil-metionina.

**SBE** - *Smad binding element*/sitio de union a Smad.

**SBF** - Suero bovino fetal.

**SDS** - Dodecil sulfato sódico.

**Ser/Thr** - Residuos de serina y treonina.

**shARN** - *Small hairpin* ARN. ARN de interferencia pequeño con conformación de horquilla, codificado en un vector de expresión.

**siARN** - *Small interfering* ARN. ARN de interferencia pequeño con conformación lineal.

**SKR3** - Proteína serin/treonin quinasa receptor 3.

**Smad** - Nombre compuesto derivado de Sma (*Caenorhabditis elegans*) y Mad (*Drosophila melanogaster*).

**Sp1** - Proteína de especificidad 1 (*Specificity protein 1*).

**SWI/SNF** - Factor de ensamblaje nucleosomal dependiente de ATP.

**TAD** - Dominio de transactivación.

**TAE** - Tampón Tris-Acetato-EDTA.

**TAF-I/SET** - *Template activating factor-I* o factor activador de molde-I.

**TAF4** - Factor 4 asociado a TBP.

**TAP** - Pirofosfatasa ácida del tabaco (*Tobacco Acid Pirophosphatase*).

**TBE** - Tampón Tris-Borato-EDTA.

**TBP** - *TATA binding protein*.

**TBS** - *Tris Buffer Saline*.

**TBS-T** - *TBS-Tween 20*.

**TGF- $\beta$**  - Factor de crecimiento transformante tipo beta.

**TSR-I** - Receptor tipo I de la superfamilia del TGF- $\beta$ .

**TSS** - Sitio de inicio de transcripción (*Transcriptional Start Site*).

**WB** - *Western blot*/inmunodetección de proteínas.

*Los vasos sanguíneos no sólo perfunden todos los tejidos del organismo y median el intercambio vital de metabolitos entre tejidos y sangre. En los últimos años, han surgido evidencias además sobre un papel paracrino en el que las células involucradas en el sistema vascular señalizan con las células diana de órganos adyacentes. Entender su naturaleza y heterogeneidad, así como sus rutas de señalización, nos dirigirá hacia la clave en la búsqueda de terapias para una gran variedad de enfermedades*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1. Angiogénesis y vasculogénesis	1
2. Los vasos sanguíneos. Ultraestructura. Diferencias morfológicas entre arterias, venas y capilares	3
3. El endotelio. Características de las células endoteliales y función	4
4. Superfamilia del TGF- $\beta$ y su relación con la morfogénesis vascular y la enfermedad	5
4.1. Ruta de señalización del TGF- $\beta$	7
4.2. <i>Activin receptor-like kinase-1</i> (ALK1)	9
4.2.1. Características bioquímicas y moleculares	9
4.2.2. Características génicas	10
4.2.3. Ligandos de ALK1: TGF- $\beta$ 1 y BMP9	11
4.2.4. Distribución tisular de ALK1 y funciones	12
4.2.5. Regulación de ALK1	13
4.3. Balance del estado de activación del endotelio mediante las rutas ALK1/ALK5	14
4.4. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria	17
5. La transcripción. Sp1 como regulador transcripcional	20
5.1. Características de las familias Sp y KLF	21
5.2. Sp1 como regulador transcripcional y mecanismos de transactivación	23
5.3. Sp1 y remodelación de cromatina	25
6. Papel de la familia <i>Krüppel-Like</i> en la biología endotelial	27
6.1. Características de la familia KLF	27
6.2. KLFs en endotelio	27
6.3. KLF6 en relación con el daño endotelial	28
7. Adaptación a bajas condiciones de presión de oxígeno en el medio endotelial	29
7.1. HIF-1 $\alpha$ como factor transcripcional mediador del estímulo hipóxico	30
7.2. HIF-2 $\alpha$	32
7.3. HIF-3 $\alpha$	32
7.4. La regulación de HIF-1 $\alpha$ y sus parálogos	33
7.4.1. Prolil-hidroxilasas	34
7.5. Genes diana de HIF-1 $\alpha$	36
<b>II. Objetivos</b>	<b>38</b>
<b>III. Materiales y métodos</b>	<b>39</b>
1. Análisis por amplificación de extremos 5' de ADN complementario (5'RACE)	39
2. Clonaje de la región 5' del promotor proximal del gen <i>ACVRL1</i>	41
2.1. Generación de varias construcciones mediante delecciones seriadas en el extremo 5' del promotor del gen <i>ACVRL1</i>	41



3. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>ACVRL1</i> y alineamiento con otras especies.....	42
4. Cultivos celulares .....	43
4.1. Tratamiento con citoquinas: TGF- $\beta$ 1 y BMP9.....	43
4.2. Tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina.....	44
4.3. Modelo de daño endotelial <i>in vitro</i> o <i>wound healing</i> .....	44
4.4. Tratamiento con desferrioxamina y cultivo de células en cámara de hipoxia .....	44
5. Vectores de expresión y metodología de la transfección.....	45
6. Ensayos de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia pequeño.....	47
6.1. Transfección de siARN-Sp1 en HEK293T.....	47
6.2. Transfección de siARN-HIF-1 $\alpha$ en HMEC-1 .....	47
6.3. Infección de HUVECs con partículas retrovirales productoras de shARN-KLF6 o shARN-HIF-1 $\alpha$ .....	47
7. Ensayos de metilación <i>in vitro</i> sobre promotor.....	48
8. Citometría de flujo .....	49
9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real ( <i>real time</i> RT-PCR).....	50
10. Electroforesis e inmunodetección de proteínas ( <i>western blot</i> ) .....	51
11. Marcaje de proteínas celulares por técnicas de inmunofluorescencia .....	52
12. Modelo de daño mecánico del endotelio <i>in vivo</i> .....	53
14. Marcaje de proteínas sobre tejido por técnicas de inmunohistoquímica.....	54
15. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	55
16. Ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA).....	56
16.1. EMSA de elementos de respuesta a Sp1 en el promotor de <i>ACVRL1</i> .....	56
16.2. EMSA de elementos de respuesta a hipoxia en el promotor de <i>ACVRL1</i> .....	57
17. Tratamiento estadístico .....	58
<b>IV. Resultados</b> .....	59
1. Caracterización de la región promotora de <i>ACVRL1</i> y estudio de su regulación por Sp1 ...	59
1.1. Identificación de dos nuevos inicios de transcripción y de una nueva región exónica en la zona 5'-proximal en el gen <i>ACVRL1</i> .....	59
1.2. El promotor de <i>ACVRL1</i> carece de cajas generales de transcripción (TATA/CAAT ) y posee múltiples sitios consenso de unión para Sp1.....	61
1.3. La región promotora 5'-proximal del gen <i>ACVRL1</i> está altamente conservada .....	63
1.4. La actividad transcripcional basal de delecciones seriadas del promotor de <i>ACVRL1</i> sugiere la presencia de regiones reguladoras positivas y negativas.....	66
1.5. Sp1 es un factor crítico para la transcripción basal de <i>ACVRL1</i> .....	67
1.6. Caracterización de dos sitios Sp1 funcionales cercanos al inicio de transcripción de <i>ACVRL1</i> .....	70
1.7. Sp1 se une <i>in vivo</i> al promotor de <i>ACVRL1</i> en células endoteliales.....	71
1.8. El estado de metilación de las islas CpG en el promotor del gen <i>ACVRL1</i> modula la expresión de ALK1 en células endoteliales.....	72

2. Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al daño endotelial .....	78
2.1. Alk1 aumenta su expresión en el endotelio durante el proceso de remodelación vascular en un modelo de ratón .....	78
2.2. ALK1 aumenta su expresión en células endoteliales dañadas <i>in vitro</i> , tras la translocación de KLF6 al núcleo .....	79
2.3. El silenciamiento de la expresión de <i>KLF6 in vitro</i> tiene como consecuencia una menor actividad transcripcional del promotor de <i>ACVRL1</i> .....	82
2.4. Ratones heterocigotos <i>Klf6<sup>+/-</sup></i> presentan una actividad transcripcional de <i>Acvrl1</i> disminuida, lo que resulta en una baja expresión de Alk1 en su vasculatura .....	83
2.5. <i>ACVRL1</i> es un gen diana de KLF6 .....	85
2.6. KLF6 interacciona con la secuencia promotora -1.035/+210 del gen <i>ACVRL1</i> en células endoteliales <i>in vivo</i> .....	86
2.7. KLF6 transactiva el promotor de <i>ACVRL1</i> mediante un mecanismo de cooperación sinérgica con Sp1 .....	88
3. Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al estímulo hipóxico .....	90
3.1. La expresión de ALK1 en células endoteliales aumenta en situación de hipoxia .....	90
3.2. El aumento de ALK1 durante hipoxia es dependiente de la presencia de HIF-1 $\alpha$ .....	93
3.3. La ruta de señalización de ALK1 se activa en condiciones de hipoxia, en paralelo al aumento en los niveles de ALK1 .....	94
3.4. El aumento en la expresión de ALK1 se debe a un incremento de los niveles de ARNm .....	94
3.5. <i>ACVRL1</i> es una diana transcripcional de HIF-1 $\alpha$ .....	95
3.6. Identificación de un sitio funcional de respuesta a HIF-1 $\alpha$ en el promotor de <i>ACVRL1</i> , responsable de su activación transcripcional en hipoxia .....	98
V. Discusión .....	101
1. Caracterización de la región promotora de <i>ACVRL1</i> y estudio de su regulación por Sp1 ..	102
2. Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al daño endotelial .....	107
3. Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al estímulo hipóxico .....	114
VI. Conclusiones .....	123

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### I. Introducción

<b>Figura 1.</b> A. Mecanismo básico de angiogénesis y vasculogénesis. B. Representación esquemática de los principales procesos involucrados en el desarrollo vascular.....	2
<b>Figura 2.</b> Diferencias estructurales entre los lechos arteriales y venosos del sistema vascular humano.....	3
<b>Figura 3.</b> Combinaciones heteroméricas de los receptores de la superfamilia de TGF- $\beta$ .....	6
<b>Figura 4.</b> Esquema de la señalización del TGF- $\beta$ desde la membrana hasta el núcleo de la célula endotelial.....	8
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la estructura de ALK1 .....	10
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática del gen <i>ACVRL1</i> y su composición en exones .....	11
<b>Figura 7.</b> Mecanismos moleculares de la angiogénesis. A. Fases de la angiogénesis. B. Esquema del equilibrio de los estados de activación o quiescencia del endotelio mediado por TGF- $\beta$ a través de las rutas ALK1/ALK5 .....	16
<b>Figura 8.</b> Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y síntomas clínicos derivados .....	19
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de los dominios funcionales de Sp1 y la comparación con los presentes en otros miembros de la familia.....	22
<b>Figura 10.</b> Comparación esquemática de los dominios funcionales de los factores más relevantes de la familia KLF expresados en endotelio.....	22
<b>Tabla 1.</b> Familia de factores Sp y sus principales características .....	24
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de transactivación mediados por Sp1 .....	24
<b>Tabla 2.</b> Miembros de la familia de factores inducidos por hipoxia dentro de los factores de transcripción bHLH-PAS.....	30
<b>Figura 12.</b> Dominios funcionales de HIF-1 $\alpha$ y comparación entre los distintos miembros de la misma familia.....	31
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de regulación de la expresión de HIF-1 $\alpha$ en respuesta a hipoxia .....	35
<b>Tabla 3.</b> Principales genes modificados por HIF-1 $\alpha$ en respuesta a hipoxia y procesos celulares en los que están implicados .....	37

### II. Objetivos

### III. Materiales y métodos

<b>Figura 14.</b> Esquema de la técnica de amplificación de extremos 5' de ADN complementario (5'RACE) .....	40
<b>Tabla 4.</b> Secuencias nucleotídicas del adaptador y de los cebadores utilizados en el 5'RACE40	
<b>Tabla 5.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para el clonaje .....	42
<b>Tabla 6.</b> Plásmidos utilizados en esta Tesis .....	46
<b>Tabla 7.</b> Anticuerpos utilizados en esta Tesis.....	49-50
<b>Tabla 8.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	51

<b>Tabla 9.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR posterior a la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	56
--	----

<b>Tabla 10.</b> Secuencias nucleotídicas de las sondas de ADN utilizadas en los ensayos de movilidad electroforética retardada (EMSA).....	58
---	----

#### IV. Resultados

<b>Figura 15.</b> Amplificación de extremos 5' de ADN complementario (5'RACE) de transcritos de <i>ACVRL1</i> en células HUVEC .....	60
--	----

<b>Tabla 11.</b> Principales sitios teóricos de reconocimiento por factores de transcripción hallados en la región promotora de <i>ACVRL1</i> .....	62
---	----

<b>Figura 16.</b> Secuencia nucleotídica de la región flanqueante en 5' del gen <i>ACVRL1</i> y análisis <i>in silico</i> de la presencia de sitios de reconocimiento teórico por diversos factores de transcripción .....	63
--	----

<b>Figura 17.</b> Alineamiento de las secuencias de los inicios de transcripción del gen <i>ACVRL1</i> entre distintas especies de mamífero.....	64
--	----

<b>Figura 18.</b> Comparación de los distintos consensos de unión de Sp1 localizados en el promotor de <i>ACVRL1</i> humano con otras especies .....	65
--	----

<b>Figura 19.</b> Actividad transcripcional del promotor del gen <i>ACVRL1</i> humano .....	67
---	----

<b>Figura 20.</b> Efecto de Sp1 en la actividad del promotor de <i>ACVRL1</i> .....	69
---	----

<b>Figura 21.</b> Demostración de la existencia de dos sitios funcionales de unión a Sp1 en el promotor de <i>ACVRL1</i> .....	70
--	----

<b>Figura 22.</b> Demostración de la unión de Sp1 endógeno al promotor de <i>ACVRL1</i> en células endoteliales HUVEC .....	72
---	----

<b>Figura 23.</b> El promotor de <i>ACVRL1</i> posee dos islas CpG.....	73
---	----

<b>Figura 24.</b> El tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) aumenta la expresión de <i>ALK1</i> en células endoteliales.....	74
--	----

<b>Figura 25.</b> Digestión de las construcciones pGL2-p <i>ALK1</i> , pXp2-TATA y pGL2-p <i>D1</i> con las enzimas de restricción <i>MspI</i> y <i>HpaII</i> , tras la metilación <i>in vitro</i> con <i>M.SssI</i> , para comprobar la efectividad del proceso.....	76
---	----

<b>Figura 26.</b> Efecto de la metilación <i>in vitro</i> sobre la actividad transcripcional del promotor de <i>ACVRL1</i> .....	77
--	----

<b>Figura 27.</b> La expresión de <i>Alk1</i> aumenta notablemente en la capa neoíntima proliferativa de arterias femorales de ratón sometidas a daño mecánico .....	79
--	----

<b>Figura 28.</b> La expresión de <i>ALK1</i> aumenta en la membrana de células endoteliales HUVEC sometidas a un modelo de daño <i>in vitro</i> .....	81
--	----

<b>Figura 29.</b> Los niveles de transcritos de <i>ALK1</i> aumentan tras el daño endotelial <i>in vitro</i> .....	82
--	----

<b>Figura 30.</b> El silenciamiento de la expresión de <i>KLF6</i> en células HUVEC disminuye la tasa de transcripción de <i>ALK1</i> e inhibe su activación tras el tratamiento con TGF- $\beta$ .....	83
---	----

<b>Figura 31.</b> Ratones heterocigotos para el gen <i>Klf6</i> expresan niveles más bajos de <i>Alk1</i> .....	84
---	----

<b>Figura 32.</b> <i>KLF6</i> transactiva el promotor de <i>ACVRL1</i> .....	86
--	----

<b>Figura 33.</b> <i>KLF6</i> interacciona con el promotor de <i>ACVRL1</i> en células HUVECs y esta interacción aumenta tras el daño a la monocapa endotelial .....	87
--	----

<b>Figura 34.</b> <i>KLF6</i> coopera funcionalmente con Sp1 mediante un mecanismo sinérgico para activar la transcripción del promotor de <i>ACVRL1</i> .....	89
--	----

<b>Figura 35.</b> La expresión de ALK1 en la superficie de células endoteliales aumenta tras el tratamiento con desferrioxamina (DFO) .....	91
<b>Figura 36.</b> La expresión de ALK1 en la superficie de células endoteliales aumenta tras el cultivo en cámara de hipoxia .....	92
<b>Figura 37.</b> El aumento en los niveles de expresión de proteína ALK1, en hipoxia, es dependiente de la presencia de HIF-1 $\alpha$ .....	93
<b>Figura 38.</b> El aumento en los niveles de ALK1, en respuesta a hipoxia, va asociado con un aumento en los niveles de activación de la vía de señalización ALK1/Smad1 .....	94
<b>Figura 39.</b> El aumento en la expresión de ALK1 durante la hipoxia se debe a un incremento en sus niveles de ARN mensajero .....	95
<b>Figura 40.</b> El promotor de <i>ACVRL1</i> responde a la hipoxia y este efecto está mediado por HIF-1 $\alpha$ .....	97
<b>Figura 41.</b> Identificación de un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) funcional en el promotor de <i>ACVRL1</i> .....	99
<b>V. Discusión</b>	
<b>Figura 42.</b> Modelo de transactivación del promotor de <i>ACVRL1</i> ejercida por KLF6 en la célula endotelial tras su translocación a núcleo en respuesta al daño.....	110
<b>Figura 43.</b> El daño en la vasculatura induce la formación de malformaciones arteriovenosas de novo en los ratones adultos con el gen <i>Acvr1</i> delecionado. ....	111
<b>Figura 44.</b> Modelo de regulación de la ruta del TGF- $\beta$ por KLF6 y de la ineficacia del proceso en HHT2, causante del desarrollo de malformaciones arteriovenosas.....	114
<b>Figura 45.</b> ALK1 aumenta su expresión en la célula endotelial de arterias coronarias que han sufrido isquemia tras infarto de miocardio .....	115
<b>Figura 46.</b> Modelo de transactivación del promotor de <i>ACVRL1</i> en la célula endotelial, mediada por HIF-1 $\alpha$ en situación de hipoxia.....	119
<b>VI. Conclusiones</b>	



## I. INTRODUCCIÓN

### 1 Angiogénesis y vasculogénesis

---

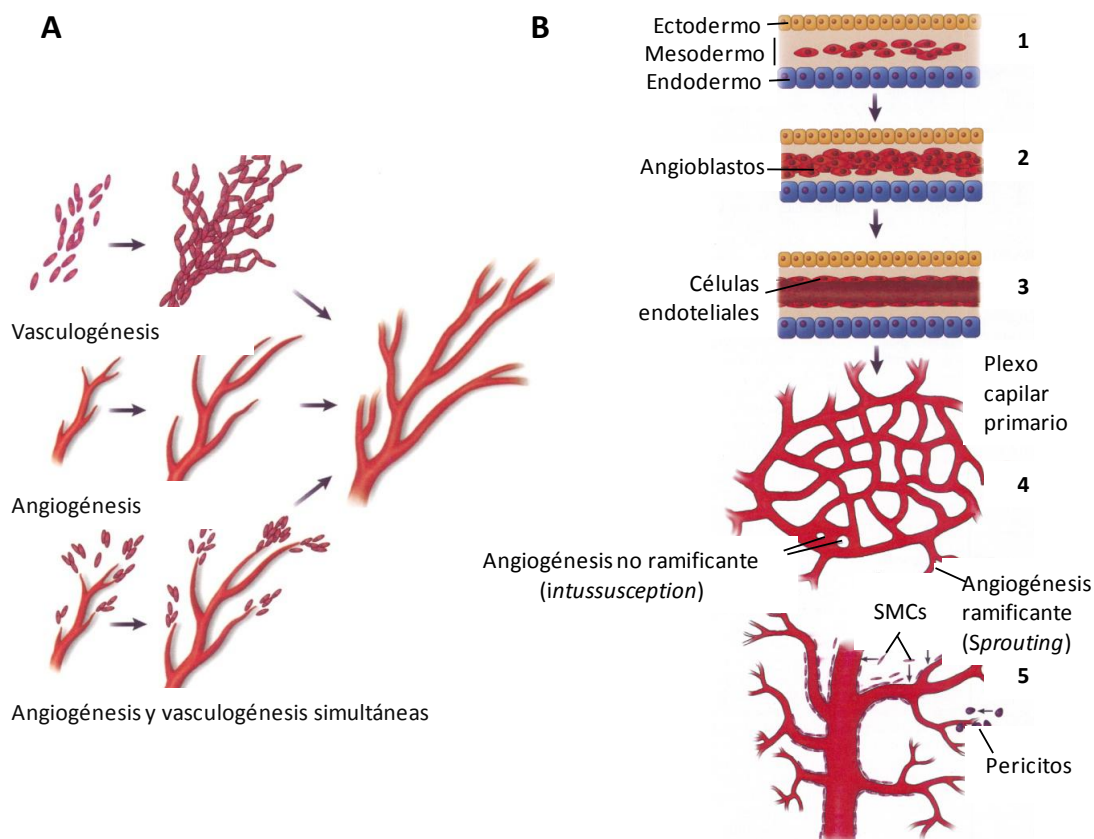
La formación del sistema vascular maduro se debe a la coordinación entre vasculogénesis y angiogénesis. Ambos son procesos celulares diferentes y por tanto su regulación se lleva a cabo por distintos mecanismos moleculares (Adams y Alitalo, 2007; Pardanaud y col., 1989; Risau, 1997; Risau y col., 1988; Yancopoulos y col., 2000).

La vasculogénesis es la formación de los vasos sanguíneos. Ocurre principalmente durante el desarrollo aunque existen diversos estudios que demuestran que también se da en el organismo adulto (Asahara y col., 1997; Murohara y col., 2000; Shi y col., 1998). Sucede por coalescencia de los precursores endoteliales (angioblastos), que se encuentran tanto libres como formando islotes en el mesodermo embrionario, para dar lugar a cordones laxos. Posteriormente generan el plexo vascular diferenciándose a células endoteliales maduras a medida que van formando los vasos definitivos en la misma posición donde originalmente se formaron (Poole y Coffin, 1989; Sabin, 2002). De este modo, la vasculogénesis es la responsable de la formación del primordio vascular y de una red capilar relativamente homogénea que será modelada para formar la red madura. Implica una serie de pasos secuenciales y estrechamente coordinados que incluyen diferenciación, migración, adhesión y maduración, y tiene como consecuencia la unión de los angioblastos en un endotelio tubular continuo (Adams y Alitalo, 2007; Poole y Coffin, 1989).

Por otra parte, la angiogénesis es el proceso de extensión de vasos ya formados por gemación de nuevos capilares gracias a la migración y proliferación de células endoteliales previamente diferenciadas. Tras el establecimiento del plexo vascular primitivo, las estructuras vasculares se propagan mediante un proceso denominado angiogénesis ramificante o germinativa (*sprouting*). Posteriormente, la estructura del plexo primitivo se va modificando por la escisión o por la fusión de los vasos preexistentes, en un proceso denominado angiogénesis no ramificante (*non-sprouting* ó *intussusception*) (Adams y Alitalo, 2007; Folkman y Klagsbrun, 1987; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Patan y col., 1996). La angiogénesis ramificante conlleva degradación proteolítica de la matriz extracelular y una proliferación simultánea de las células endoteliales. Las células preexistentes liberan estímulos mitogénicos que atraen células precursoras circulantes al punto de ramificación.

Si bien se considera, de manera general, que la vasculatura de los órganos se crea mediante el proceso angiogénico, algunos órganos de origen endodérmico como hígado,

pulmón, páncreas, estómago, intestino y bazo, poseen una red vascular de origen vasculogénico.



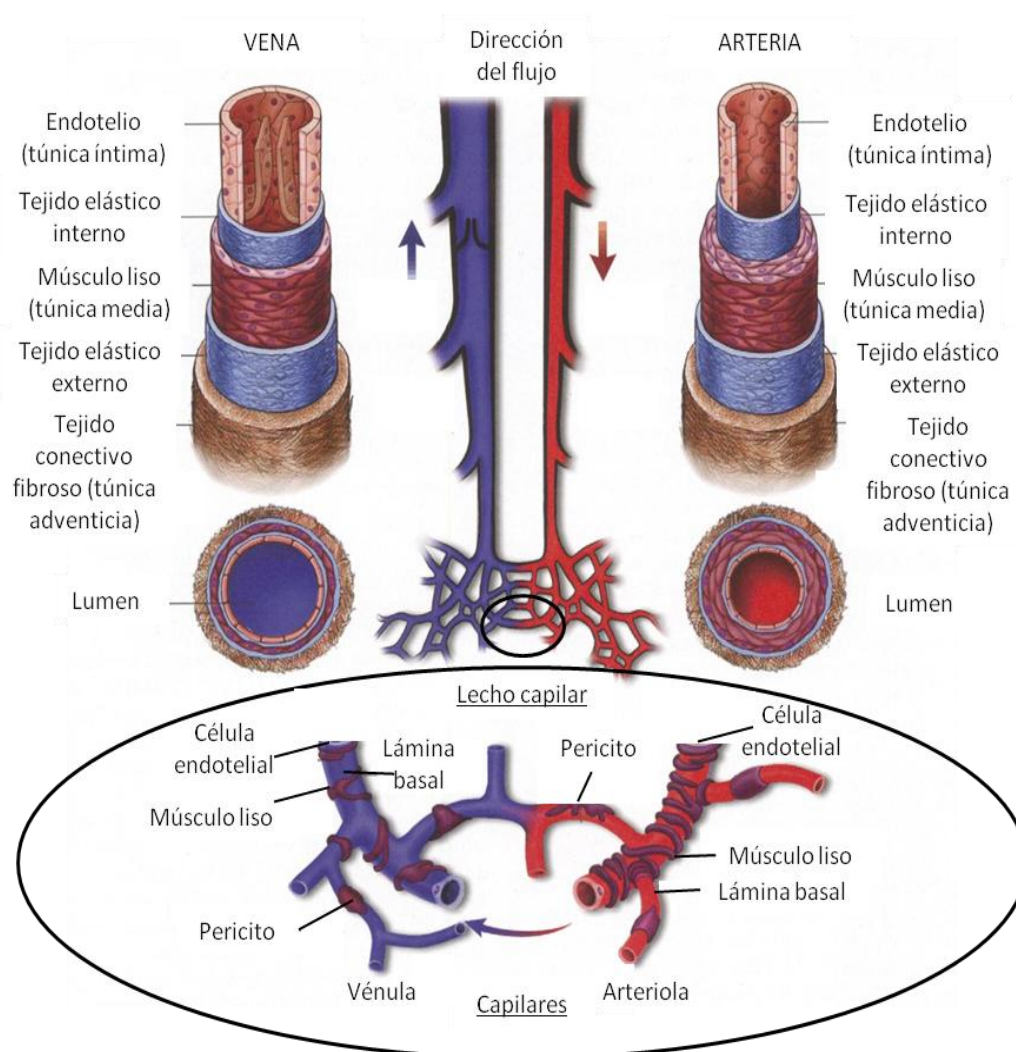
**Figura 1. A. Mecanismo básico de angiogénesis y vasculogénesis.** En la vasculogénesis, las células precursoras endoteliales (angioblastos) se agrupan en el mesodermo durante el desarrollo formando nuevos lechos vasculares. La angiogénesis, en cambio, es la prolongación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, y se produce por el reclutamiento de células endoteliales adultas en respuesta a diversos estímulos moleculares (promovidos por un tumor cercano, un traumatismo o un estímulo hormonal menstrual, entre otros). También pueden darse ambos procesos simultáneamente, como es el caso del desarrollo de la vasculatura del pulmón. **B. Representación esquemática de los principales procesos involucrados en el desarrollo vascular.** 1) Los angioblastos se diferencian a partir del mesodermo y 2) forman cordones en el mismo sitio, o migran a otro. 3) Las células endoteliales se diferencian y forman tubos. 4) El plexo vascular primario se extiende y se va volviendo más complejo gracias a procesos angiogénicos ya sean ramificantes (*sprouting*) o no ramificantes (*non-sprouting* o *intussusception*). 5) Se produce una remodelación vascular, que conduce a la formación de vasos grandes y pequeños. Finalmente, el endotelio madura y se reclutan células mesenquimales hacia la pared vascular (pericitos y células musculares lisas/SMCs). Adaptado de Cleaver y Krieg, 1999.

Por tanto, en el individuo adulto, los cambios que se generan en el sistema circulatorio responden siempre a estímulos angiogénicos y antiangiogénicos. De este modo, el sistema circulatorio es capaz de reorganizarse según las necesidades de irrigación de un órgano en un determinado momento, siendo capaz de dar una rápida respuesta a las necesidades de oxígeno y nutrientes mediante creación de nuevos vasos a partir de los ya existentes. Este proceso tan necesario en la fisiología normal del organismo se vuelve perjudicial en algunas patologías de tipo tumoral, donde la terapia va dirigida a evitar la irrigación del tumor



mediante inhibición de la neo-angiogénesis promovida por el tumor (Carmeliet, 2005; Carmeliet y Baes, 2008; Ferrara y Kerbel, 2005). Además de los tumores, los mecanismos moleculares implicados en la respuesta al estímulo angiogénico son hoy en día una diana farmacéutica importantísima en diabetes y en numerosas patologías vasculares.

## 2 Los vasos sanguíneos. Ultraestructura. Diferencias morfológicas entre arterias, venas y capilares.



**Figura 2. Diferencias estructurales entre los lechos arteriales y venosos del sistema vascular humano.** La principal diferencia reside en el calibre del vaso, mayor en el caso de las grandes venas, y en la capa muscular, más engrosada en las grandes arterias. Esto tiene una explicación funcional: las arterias son las encargadas de distribuir la sangre que bombea el corazón hacia todos los rincones del organismo, y por tanto están sometidas a una gran presión arterial, mientras que las venas reciben la sangre de retorno, con menor presión, y poseen unas válvulas que impiden el reflujo en sentido contrario. Adaptado de Cleaver y Krieg, 1999.

Una compleja red de arterias, venas y capilares distribuye la sangre a lo largo del organismo. Para incrementar el transporte de sangre a los tejidos en crecimiento, las arterias y

las venas se expanden creciendo concéntricamente y mediante remodelación vascular, mientras que los capilares crecen mediante angiogénesis ramificante dando cada vez redes más complejas. Esta transformación es evidente durante la embriogénesis, pero procesos similares de remodelación ocurren más tarde durante el desarrollo en procesos angiogénicos tanto fisiológicos como patológicos.

La diferenciación arteriovenosa continúa durante el desarrollo y refleja las distintas propiedades hemodinámicas de los distintos componentes de la red vascular. Capas concéntricas de células musculares lisas (VSMCs, del inglés *vascular smooth muscle cells*), así como proteínas de matriz extracelular y fibras elásticas, permiten a las arterias resistir el estrés de flujo laminar y flujo pulsátil al que las somete la sangre. Las venas soportan poca presión pero requieren de la presencia de válvulas que se abren unidireccionalmente permitiendo el flujo de retorno hacia el corazón. Las venas también están rodeadas por VSMCs, pero con un menor grado de recubrimiento que las arterias. Las VSMCs están separadas de las células endoteliales por una membrana basal. Los capilares, en lugar de VSMCs, están recubiertos por pericitos, que contactan directamente con las células endoteliales. Ambos tipos celulares (pericitos y VSMCs) son de naturaleza mesenquimal, tienen morfología fibroblástica y se denominan células murales.

### 3 El endotelio. Características de las células endoteliales y función.

---

El endotelio es un tipo de monocapa celular que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos. Actualmente ha dejado de considerarse como mera barrera que intercambia nutrientes y desechos entre la sangre y los tejidos para pasar a ser considerado como órgano vital ya que de su correcto funcionamiento depende la fisiología vascular. Su disfunción puede ser causa de diversas patologías como la ceguera asociada a diabetes, artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, síndrome hemolítico urémico (SHU), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT), hipertensión, arterioesclerosis y trombosis (Goligorsky, 2000; Gresele y col., 2010; Hack y Zeerleder, 2001; Jones y col., 2001), además de contribuir al mal pronóstico del cáncer.

Las observaciones clínicas, patológicas y experimentales de la fisiología vascular apoyan el papel fundamental de la célula endotelial en el mantenimiento de la homeostasis vascular y sugieren que su disfunción contribuye al desarrollo de dichas enfermedades. La célula endotelial es el punto crítico en el que diversos estímulos fisiológicos son integrados y transducidos, y participa activamente en la regulación de la permeabilidad selectiva, así como

en la coagulación sanguínea y en la migración y trasvase (*homing*) de las células inmunes a sitios específicos del organismo (Cleaver y Melton, 2003). Su fenotipo puede variar en respuesta a multitud de estímulos, como son el estrés de flujo laminar, que induce proteínas como la eNOS y la trombomodulina, con propiedades antitrombóticas, antiadhesivas y antiinflamatorias (Bergh y col., 2009). Por el contrario, citoquinas proinflamatorias, el flujo turbulento o los productos de glicosilación avanzada de pacientes diabéticos, pueden convertir el endotelio en disfuncional, al disminuir la expresión de eNOS, inducir los niveles de VCAM-1 (*Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*) y observarse un fenotipo procoagulante (Gimbrone y col., 2000; Wautier y Schmidt, 2004).

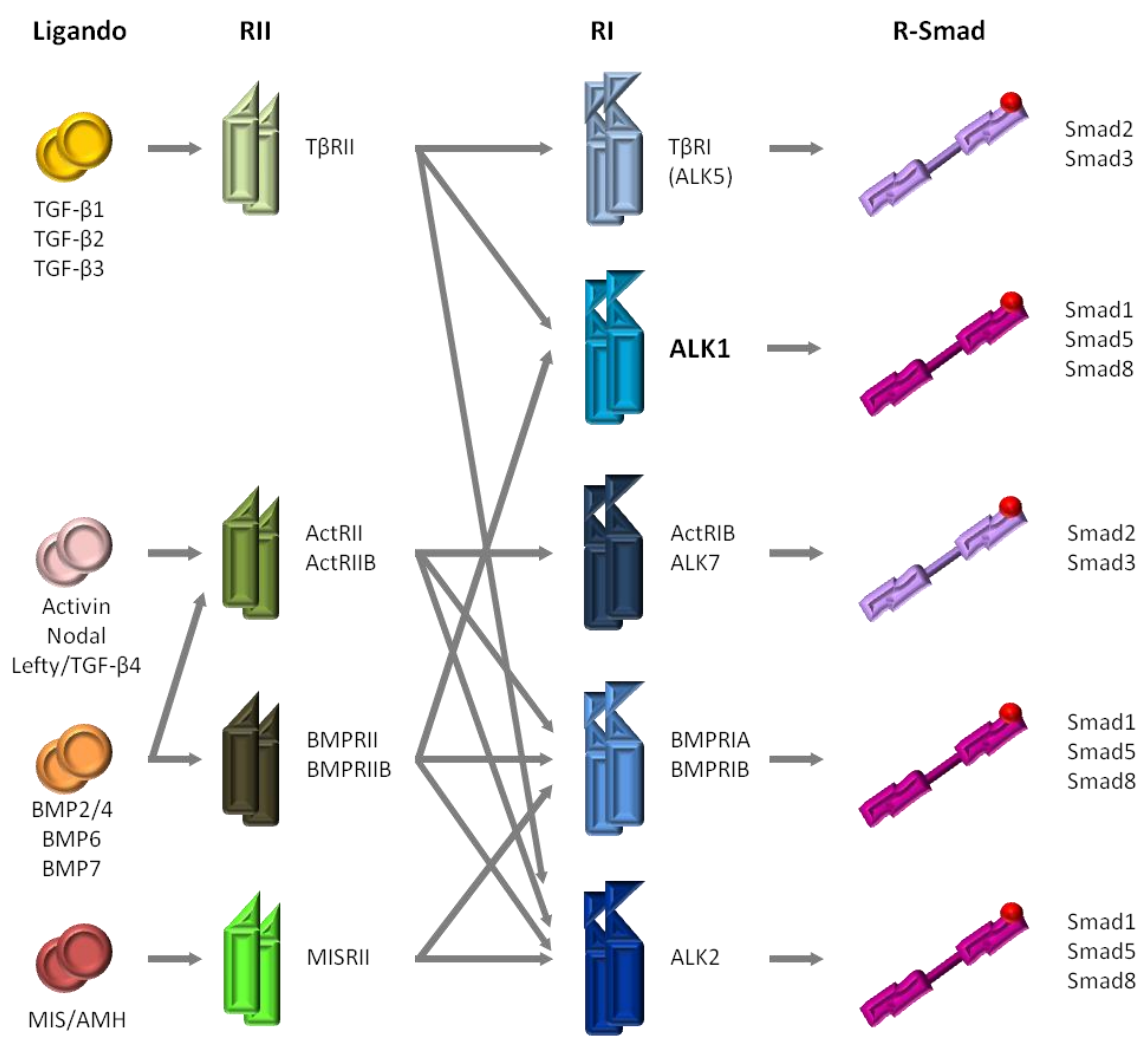
#### 4 Superfamilia del TGF- $\beta$ y su relación con la morfogénesis vascular y la enfermedad

---

El factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es el prototipo de una gran superfamilia de citoquinas conservadas a lo largo de la evolución. Hasta la fecha, más de sesenta miembros de la superfamilia han sido identificados en el genoma de múltiples organismos, y entre treinta y cuarenta se han hallado en el genoma humano. De entre los miembros que se han encontrado expresados como proteína en el ser humano, se incluyen tres isoformas de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), cinco activinas y al menos ocho proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Heldin y col., 1997; Schmieder y Hill, 2007; Shi y Massague, 2003), además de inhibinas, la Hormona Anti Mülleriana (AMH, también llamada MIS ó Sustancia Inhibidora Mülleriana), nodales, miostatinas y proteínas osteogénicas (Massague y col., 2005; Roberts y Sporn, 1993). Todos ellos son polipéptidos que se sintetizan en la célula como precursores proteicos en forma dimerica y posteriormente son procesados por proteasas y secretados al medio extracelular para activar respuestas celulares durante procesos de crecimiento y diferenciación (ten Dijke y Arthur, 2007). Son importantes durante el desarrollo embrionario y, en el organismo adulto, regulan homeostasis tisular y están frecuentemente implicados en diversas condiciones patológicas (Gordon y Blobel, 2008; Goumans y Mummery, 2000; Piek y col., 1999).

La importancia vital que la señalización mediada por el TGF- $\beta$  tiene en la biología endotelial se puso de manifiesto tras la identificación de diversas patologías vasculares causadas por la presencia de mutaciones en los genes de receptores de TGF- $\beta$  (Gallione y col., 2004; Johnson y col., 1996; McAllister y col., 1994). No sólo es patogénica la mutación en los receptores, sino también aquellas mutaciones que supongan un cambio en la disponibilidad de

isoformas activas de TGF- $\beta$  en el medio extracelular (mutaciones en las proteínas implicadas en la activación del propéptido, así como en proteínas de anclaje presentes en la matriz extracelular), como lo demuestran estudios recientes sobre algunos síndromes cardiovasculares como el síndrome de Marfan y la preeclampsia (ten Dijke y Arthur, 2007). En paralelo a esas observaciones sobre la patología humana, los estudios genéticos en ratones han revelado el papel central que el TGF- $\beta$  tiene durante la angiogénesis ya que, en ausencia de dichos receptores, la angiogénesis del saco vitelino no se produce con normalidad y se bloquea en estadios tempranos con fatales consecuencias para el embrión (Goumans y Mummery, 2000; Pepper, 1997).



**Figura 3. Combinaciones heteroméricas de los receptores de la superfamilia de TGF- $\beta$ .** Los ligandos de TGF- $\beta$  se unen a combinaciones específicas de heterotetrámeros RI-RII en la superficie celular. Se muestran los ligandos y los receptores RI y RII que participan en cada vía de señalización. La activación de los factores de transcripción tipo Smad que ocurre como consecuencia de cada ruta se muestra a la derecha. MIS/AMS = Sustancia inhibidora Mülleriana/Hormona anti-Mülleriana. Adaptado de Feng y Derynck, 2005.

Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  llevan a cabo sus acciones mediante la unión a un complejo receptor que consta de dos receptores (tipo I y tipo II) con actividad Ser/Thr-

quinasa. Hay seis receptores tipo II (RII) y siete receptores tipo I (RI) descritos hasta la fecha en mamíferos (Heldin y col., 1997; Schmierer y Hill, 2007; Shi y Massague, 2003).

En el caso del TGF- $\beta$  el receptor tipo II es el T $\beta$ RII y el receptor tipo I es T $\beta$ RI/ALK5 (*Activin receptor-like kinase-5*). En las células endoteliales, el TGF- $\beta$  puede señalizar, además, por ALK1, ya que ambos receptores tipo I (ALK5 y ALK1) se coexpresan en este tipo celular (Goumans y col., 2002; Oh y col., 2000).

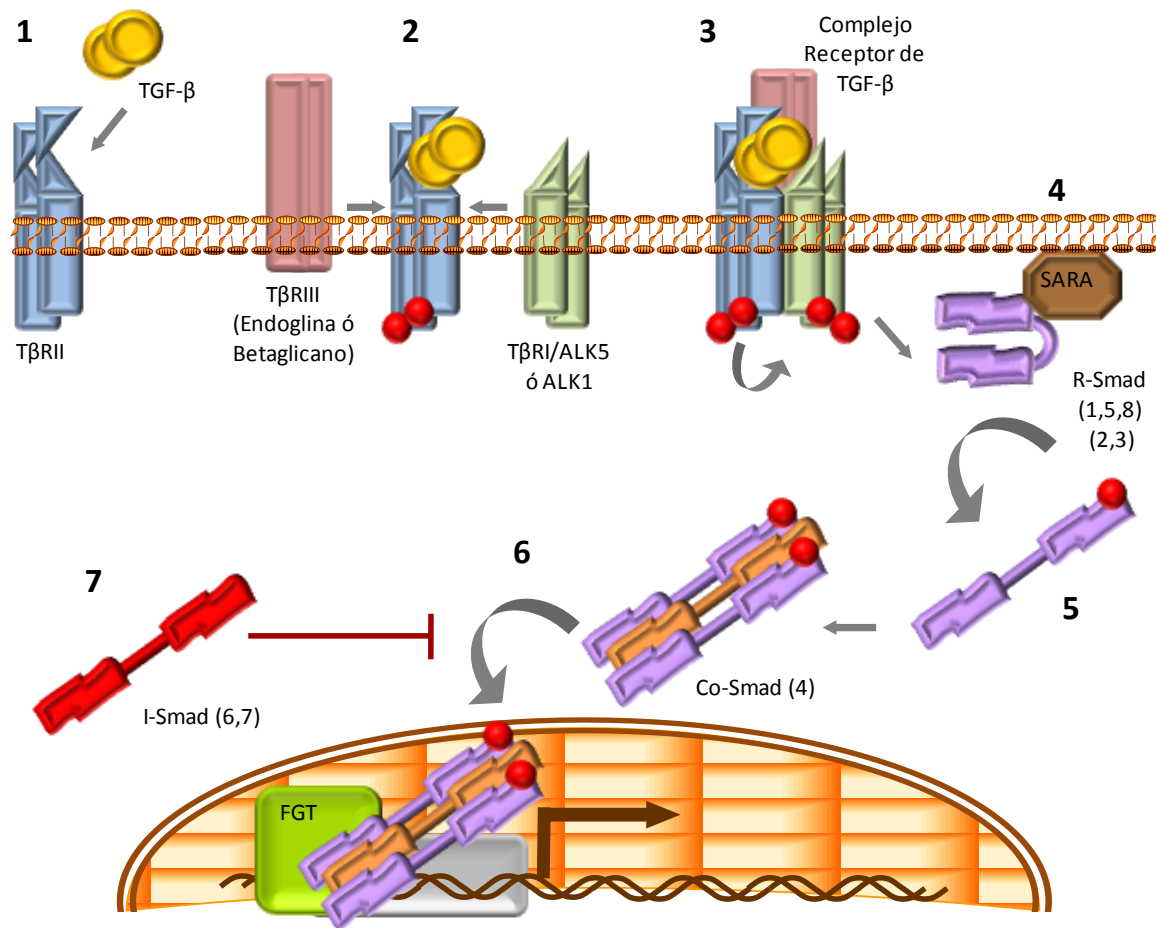
#### 4.1 Ruta de señalización del TGF- $\beta$

---

El acceso del TGF- $\beta$  a los receptores tipos I y II está regulado por la unión del ligando a proteínas solubles del medio extracelular y por la modulación llevada a cabo por los correceptores o receptores tipo III (T $\beta$ RIII) accesorios, endogлина y betaglicano (ten Dijke y Arthur, 2007; ten Dijke y col., 2008).

Cuando el TGF- $\beta$  circulante se une al dímero de membrana T $\beta$ RII (que está constitutivamente activado por autofosforilación en residuos Ser-Thr), el dímero T $\beta$ RI es reclutado al complejo y fosforilado por T $\beta$ RII en residuos Ser específicos en la región yuxtamembrana. A su vez el correceptor (T $\beta$ RIII, endogлина o betaglicano) se une a ellos y el complejo activo transduce la señal hacia el interior de la célula mediante las Smads (*Sma* y *Mad-related*). Las Smads reguladas por receptor (R-Smads) se encuentran en estado basal concentradas en el citoplasma y en las cercanías de la membrana gracias a su interacción con ciertas proteínas de anclaje, de las cuales la mejor caracterizada es la proteína SARA (*Smad anchor for receptor activation*) (Tsukazaki y col., 1998). La afinidad de la unión a SARA decrece tras la fosforilación por T $\beta$ RI en dos residuos serina del extremo carboxi-terminal de R-Smad, ya que estos residuos están implicados en la interacción entre ambas proteínas.

ALK5 fosforila Smad2 y Smad3, mientras que ALK1 es el responsable de la fosforilación de Smad1, Smad5 y Smad8 (Goumans y col., 2009). Las R-Smads activadas forman un complejo con la Smad cooperadora (co-Smad), que en mamíferos es Smad4, y se translocan al núcleo, donde regulan, junto con otras proteínas, la transcripción de genes específicos. Como mecanismo regulador negativo, las Smads inhibitoras (I-Smads) Smad6 y Smad7 pueden inhibir la activación de las R-Smads mediante competición por los receptores tipo I y mediante el reclutamiento de ubiquitina-ligasas o de fosfatasas específicas hacia el receptor activado, marcándolo para degradación proteosomal o defosforilándolo, respectivamente (Heldin y col., 1997; Schmierer y Hill, 2007; Shi y Massague, 2003; Valdimarsdottir y col., 2006).



**Figura 4. Esquema de la señalización del TGF-β desde la membrana hasta el núcleo de la célula endotelial.** El TGF-β circula por el torrente sanguíneo y es captado en la membrana de la célula endotelial por el dímero de receptor tipo II (1) (TβRII), que se autofosforila en residuos Ser-Thr (2). Eso produce el reclutamiento del dímero de receptor tipo I (TβRI/ALK5 ó ALK1) y del correceptor endogлина o betaglicano (también conocido como TβRIII). La unión del ligando estabiliza la formación del complejo y el TβRII fosforila residuos Ser-Thr del dominio GS del TβRI, activando el complejo (3). Tras ello, las Smads dependientes de receptor (R-Smads), que son atraídas a las inmediaciones de la membrana gracias a proteínas de anclaje como SARA (4), son fosforiladas en su dominio C-terminal, lo cual cambia su conformación (5) y crea un sitio de unión para la Smad cooperadora (Co-Smad) que en mamíferos es siempre Smad4. Smad4 puede asociarse en el citoplasma y entrar al núcleo como complejo con las R-Smads o puede asociarse dentro del núcleo tras la traslocación de las R-Smads activadas (6). Una vez allí, el complejo interactúa con el ADN de los genes diana, con los factores generales de transcripción (FGT) y con una gran diversidad de coactivadores y correpresores específicos en cada caso, y como resultado se obtiene la modulación de la expresión génica en respuesta al entorno celular. Este proceso está regulado negativamente por las Smads inhibitoras (I-Smad) (7). Las R-Smad se desfosforilan y pueden ser recicladas o bien marcadas con ubiquitina por la familia Smurf de ubiquitina-ligasas y degradadas por el proteasoma (no mostrado).

Las Smads interactúan con coactivadores como el CBP/p300 lo cual permite al complejo Smad intensificar la actividad transcripcional inherente a otros factores transcripcionales con los que pueden acomplejarse sobre ciertas dianas génicas, por tanto, pueden ser consideradas como un complejo coactivador para algunos factores de transcripción (Derynck y Zhang, 2003; Shi y Massague, 2003). Las secuencias específicas en el ADN que son reconocidas por las Smads se denominan SBE (*Smad-binding elements*) y su secuencia es 5'-GTCT-3' o la complementaria 5'-AGAC-3'. Los promotores que responden a TGF-β contienen uno o más



SBEs, que en muchos casos puede contener una base extra, como 5'-CAGAC-3'. La afinidad de las Smads por un solo sitio SBE es muy pequeña, aumentando exponencialmente cuando los sitios SBE se encuentran en tándem (Zawel y col., 1998). Por tanto, los promotores que responden a Smads suelen contener concatémoros de sitios SBEs, y aquéllos que poseen más de cuatro, requieren la cooperación de otros factores para una unión a ADN efectiva (Seoane y col., 2004).

Las Smads son consideradas como las proteínas transductoras de la señal del TGF- $\beta$  específicamente, aunque pueden establecer reacciones cruzadas con rutas de señalización mediadas por otros ligandos. No obstante, no todas las señales que el TGF- $\beta$  ejerce en la célula están mediadas por las Smads, existiendo lo que se denominan respuestas “no-Smad” o “no canónicas” del TGF- $\beta$ . Dentro de estas respuestas se incluyen las mediadas por la ruta de MAPKs (*Mitogen activated protein kinases*), GTPasas similares a Rho, y la ruta de PI3K/AKT (Derynck y Zhang, 2003; Feng y Derynck, 2005; Moustakas y Heldin, 2005; Zhang, 2009). Las señales nucleares transmitidas por estas vías de señalización pueden regular la transcripción en un modo independiente de las Smads o bien actuando sinérgicamente con ellas.

## 4.2 *Activin receptor-like kinase-1 (ALK1)*

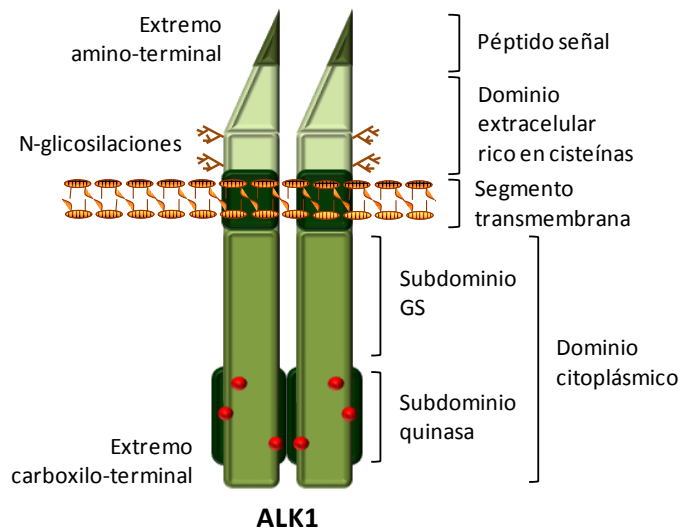
---

### 4.2.1 *Características bioquímicas y moleculares*

---

ALK1 es una proteína homodimérica transmembrana localizada en la superficie celular, y es un receptor tipo I de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Por ello fue denominado en un primer momento TSR-I. El nombre de ALK1 lo adquirió posteriormente al ser caracterizado por su similitud con el receptor tipo II de activina, a partir de células endoteliales de cordón umbilical humano (Attisano y col., 1993; ten Dijke y col., 1993).

Consta de 503 aminoácidos y su peso molecular es de unos 55-65 kDa. Posee un pequeño péptido señal en el extremo amino-terminal de su dominio extracelular, seguido de una zona rica en cisteínas y en glicosilaciones en grupos amino de las cadenas laterales de asparraginas y glutaminas, un segmento transmembrana y un largo tallo citoplásmico en el cual hay una región rica en glicina y serina (llamado subdominio GS), y un subdominio Ser/Thr-quinasa que presenta un alto grado de similitud con los de otros receptores tipo I del TGF- $\beta$  (ten Dijke y col., 1994). Cuando interacciona con el dímero de T $\beta$ RII, éste fosforila una secuencia conservada situada en el dominio GS de ALK1, activándolo.



**Figura 5. Representación esquemática de la estructura de ALK1.** El receptor consta de un péptido señal que dirige la proteína hacia la membrana tras su síntesis, un dominio extracelular con abundantes cisteínas y glicosilaciones en grupos amino (de las cadenas laterales de asparraginas y glutaminas), un segmento transmembrana (que se encuentra inmerso en la membrana plasmática gracias a su composición hidrofóbica) y un dominio citoplásmico (que posee una región GS -rica en glicina y serina- y un subdominio catalítico con actividad Ser/Thr quinasa). En rojo se muestran las fosforilaciones de ALK1 por parte del T $\beta$ RII y que activan su capacidad catalítica.

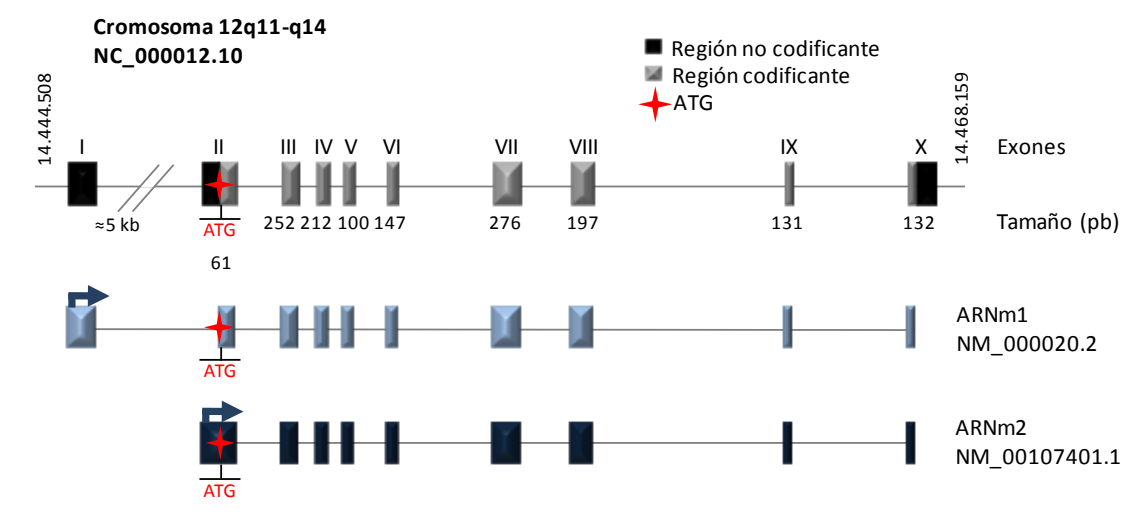
#### 4.2.2 Características génicas

En el año 1993, ten Dijke y colaboradores clonaron cuatro ADNc usando técnicas basadas en PCR a partir del receptor humano de Activina tipo II (ten Dijke y col., 1993). Dichos ADNc codificaban cuatro proteínas con actividad Ser/Thr-quinasa y las denominaron ALK1, ALK2, ALK3 y ALK4. Estas proteínas compartían aproximadamente un 40% de su secuencia con los receptores de activina tipo II y IIB, el receptor de TGF- $\beta$  y Daf1 (homólogo en *Caenorhabditis elegans*) en sus dominios quinasa, y entre ellos mismos hasta un 60 y un 79% de homología de secuencia, lo cual sugería que formaban una subfamilia de receptores con actividad Ser/Thr quinasa. Asimismo, por estudios de hibridación con sondas marcadas radiactivamente sobre ARN (*Northern Blot*) observaron que la expresión mayoritaria de ALK1 se hallaba en placenta y pulmón.

Simultáneamente, Attisano y colaboradores clonaron otro ADNc al que denominaron TSR1 (Receptor tipo I de la superfamilia del TGF- $\beta$ ), con los mismos datos de localización tisular (Attisano y col., 1993). Posteriormente caracterizaron el producto del gen concluyendo que el gen *ACVRL1* (*Activin A receptor type II-like 1*) daba lugar a una proteína transmembrana con actividad quinasa que se asociaba con el receptor tipo II de la superfamilia del TGF- $\beta$  para generar diversos complejos heteroméricos Ser/Thr quinasa con diferentes capacidades de señalización.



El gen que codifica la expresión de ALK1 se denomina *ACVRL1*, aunque también se le han dado otras denominaciones como *ORW2* (de la denominación de la enfermedad que produce, *Osler-Rendu-Weber type 2*), *TSR-I*, *ACVRLK1*, y *SKR3* (*Ser/Thr-protein kinase receptor 3*). La región codificante del gen se extiende a lo largo de 15.944 pares de bases, localizadas en el brazo largo del cromosoma 12 (12q11-q14), en la hebra positiva (Berg y col., 1997). El gen posee 9 exones codificantes, nombrados del 2 al 10, y un exon que se transcribe pero no se traduce, el exon 1. Hasta la fecha se han descrito dos transcritos diferentes, que difieren en el inicio de transcripción y en su extremo 5'. En el primer caso resulta un transcrito de 4.263 pares de bases (ARNm 1: NM\_000010.2) y en el segundo caso tiene un extremo 5' más corto, careciendo de exon 1 y con un exon 2 algo más extenso en su parte 5', resultando en un transcrito de 4.126 pares de bases (ARNm 2: NM\_001077401.1). Ambos dan lugar a la misma proteína de 503 aminoácidos, ya que comparten exactamente la misma secuencia desde la señal de inicio de traducción ATG.



**Figura 6. Representación esquemática del gen *ACVRL1* y su composición en exones.** El gen *ACVRL1* posee diez exones, de los que 9 son codificantes y uno se transcribe pero no se traduce (Exon 1). Hasta la fecha se han descrito dos variantes de ARNm, que difieren ligeramente en la secuencia 5' del exon 2. Ambas variantes mantienen el inicio de traducción en el mismo sitio dando la misma proteína de 503 aminoácidos. Se muestran los dos orígenes de transcripción descritos (flechas azules) y el origen de traducción ATG (estrella roja). Modificado de Berg y col., 1997.

#### 4.2.3 Ligandos de ALK1: TGF- $\beta$ 1 y BMP9

En el año 1996, Johnson y colaboradores pusieron de manifiesto la alta expresión de ALK1 en células endoteliales y en tejidos altamente vascularizados como placenta y pulmón. Asimismo, observaron que su expresión era paralela a la de endoglin, proteína correceptora de TGF- $\beta$ . De este modo, sugirieron que endoglin era responsable de captar al TGF- $\beta$

circulante y presentar el ligando a un complejo receptor formado por ALK1 y un receptor tipo II (Johnson y col., 1996). En ese año se relacionó por primera vez la mutación en ALK1 con la aparición de HHT2 (Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 2 o Síndrome de Rendu-Osler-Weber tipo 2), denominada así por su similitud con la HHT1 descrita en el caso de mutaciones en el gen de endoglina (*ENG*), presentando ambas enfermedades el mismo cuadro clínico, al estar implicadas las dos proteínas en la misma ruta de señalización (Berg y col., 1997; Johnson y col., 1996; McAllister y col., 1994).

Durante mucho tiempo, ALK1 fue considerado un receptor huérfano ya que, si bien era capaz de asociarse con los receptores tipo II de Activina (ActR-II) y de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-II), no activaba el reportero derivado del promotor de *PAI-1*, como era de esperar para ambas cascadas de señalización. No obstante, no se descartaba que tanto activina como TGF- $\beta$  fueran ligandos de ALK1 pero actuaran por distintas rutas señalizadoras. En el año 1999 se demostró que ALK1, en colaboración con el receptor tipo II de TGF- $\beta$ , era capaz de inducir la activación de *PAI-1* y que sus ligandos fisiológicos eran TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, así como un tercer ligando desconocido (Lux y col., 1999; Oh y col., 2000). Recientemente se ha descrito que dos ligandos solubles distintos de la superfamilia del TGF- $\beta$ : BMP9 y BMP10, implicados en migración y crecimiento celular, son ligandos específicos de ALK1, induciendo una respuesta específica y sostenida en el tiempo (David y col., 2007; Scharpfenecker y col., 2007).

#### 4.2.4 Distribución tisular de ALK1 y funciones

---

La expresión de ALK1 se halló primeramente en tejidos altamente vascularizados como son el pulmón, la placenta y el corazón (Johnson y col., 1996), si bien más tarde se detectó su expresión en otras localizaciones como las células epiteliales durante la transición epitelio-mesénquima (Jonson y col., 2001), los monocitos (Mo y col., 2002; Sanz-Rodriguez y col., 2004), las células del corazón (Su y col., 2004), la microglía neural (Konig y col., 2005), los fibroblastos de la piel (Beger y col., 2006), las células esteladas hepáticas (Li y col., 2008), los condrocitos (Finnson y col., 2008), las células de la cresta neural (Mancini y col., 2007) y, más recientemente, los mioblastos (Velasco y col., 2008). Además, su expresión se pone de manifiesto de modo característico en condiciones patológicas en algunos tipos celulares como las células pancreáticas en cáncer (Jonson y col., 2001; Roelen y col., 1997; Ungefroren y col., 2007).

A la vista de todos estos datos, durante un tiempo se tendió a no considerar a ALK1 como una molécula específica de tejido endotelial. Posteriormente, en el año 2006, Andreas Lux y

colaboradores demostraron en un ensayo de micromatrices de ADN (*microarrays*) que al infectar células endoteliales HMEC-1 y HUVEC con un receptor ALK1 constitutivamente activado (por mutación en sus dominios quinasa) todos los genes que se modificaban estaban implicados en angiogénesis (Lux y col., 2006). Por tanto, pese a no ser una proteína estrictamente exclusiva de endotelio, estos resultados evidencian su relevancia en dicho tipo celular, siendo protagonista principal del proceso angiogénico, y por tanto se sigue considerando una molécula eminentemente endotelial, ya que además éste es el tejido donde se expresa mayoritariamente.

De hecho, hay cada vez más evidencias de que ALK1 juega un papel fundamental en la diferenciación arteriovenosa de los vasos durante el desarrollo (Seki y col., 2003; Sorensen y col., 2003; Urness y col., 2000). La expresión de ALK1 en endotelio ocurre principalmente en arterias durante el desarrollo embrionario y durante las etapas de crecimiento postnatal, y esta expresión se induce en las arterias nacientes y en remodelación en el ratón durante el proceso angiogénico tras un daño vascular o por tumorigénesis (Seki y col., 2003). En el pulmón de ratón, ALK1 no se detecta en venas pulmonares ni arterias pulmonares excepto en el endotelio de las vénulas distales y las arteriolas (Mahmoud y col., 2009).

También es una proteína implicada en la regulación de la formación de adhesiones focales y en la curación de heridas por las células epidérmicas, y el desarrollo de HHT2 está relacionado con una mayor propensión a aparición de Hipertensión Pulmonar Primaria (Harrison y col., 2003).

#### 4.2.5 Regulación de ALK1

---

Los dominios extracelular y citoplásmico de endogлина interaccionan con ALK1, potenciando su señalización mediante una cooperación funcional favoreciendo la proliferación de la célula endotelial (Blanco y col., 2005). Al tratarse de una Ser/Thr quinasa, ALK1 puede estar regulada a dos niveles distintos: bien mediante la modulación de su expresión génica, incluyendo la transcripción, o bien mediante la regulación de su actividad enzimática.

La caracterización del promotor de *ACVRL1* y el estudio de su regulación transcripcional no han sido abordados hasta ahora, si bien existen datos muy interesantes que hablan sobre la presencia de una región intensificadora de la transcripción hallada en ratón, y situada a lo largo de una región amplia, de 9 kb de genoma, desde 2,7 kb antes del primer exón hasta el intrón 2 completo (Li y col., 2009; Seki y col., 2004). Esta región intensificadora parece ser la responsable en ratón de la expresión específica en endotelio de ALK1.

Con respecto a la regulación de la expresión de ALK1 en la célula endotelial, donde hay una gran cantidad de moléculas de ALK1 en la membrana, estudios hechos en nuestro laboratorio han demostrado que ALK1 se expresa preferencialmente en caveolas, microdominios de membrana ricos en caveolina 1. De hecho hemos demostrado que caveolina 1 coopera funcionalmente con ALK1 interaccionando con él y potenciando su señalización en respuesta al TGF- $\beta$ . Este hecho es de una importancia radical ya que la inmensa mayoría de las interacciones de caveolina 1 conocidas hasta el momento tienen como resultado la represión de la señalización de la molécula con la que interacciona, siendo la interacción con ALK1 una de las escasas interacciones positivas que caveolina 1 ejerce en la célula endotelial, llevando a la proliferación de la célula (Santibanez y col., 2007).

Otra proteína capaz de regular la actividad de ALK1 es la Casein quinasa-2 $\beta$  (CK2 $\beta$ ), cuya interacción se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta interacción también potencia la señalización resultando en una mayor fosforilación de los transductores Smad1/5/8 y en una mayor activación de reporteros en respuesta a TGF- $\beta$ 1 y BMP9 (Lee y col., 2009).

Como regulación negativa de la ruta, la actividad inhibitoria de Smad7 se induce específicamente por ALK1 en células endoteliales, donde ejerce un efecto inhibitorio en pasos ulteriores de la señalización de TGF- $\beta$ , dando lugar al bloqueo de la señal. Smad7 es capaz de interaccionar con ALK1 reclutando a la fosfatasa PP1 $\alpha$ , que desfosforila e inactiva a ALK1 (Valdimarsdottir y col., 2006). Con este mecanismo, ALK1 ejerce un bucle de retroalimentación negativo sobre su propia vía de señalización en la célula endotelial, cuando las condiciones fisiológicas del medio así lo requieren.

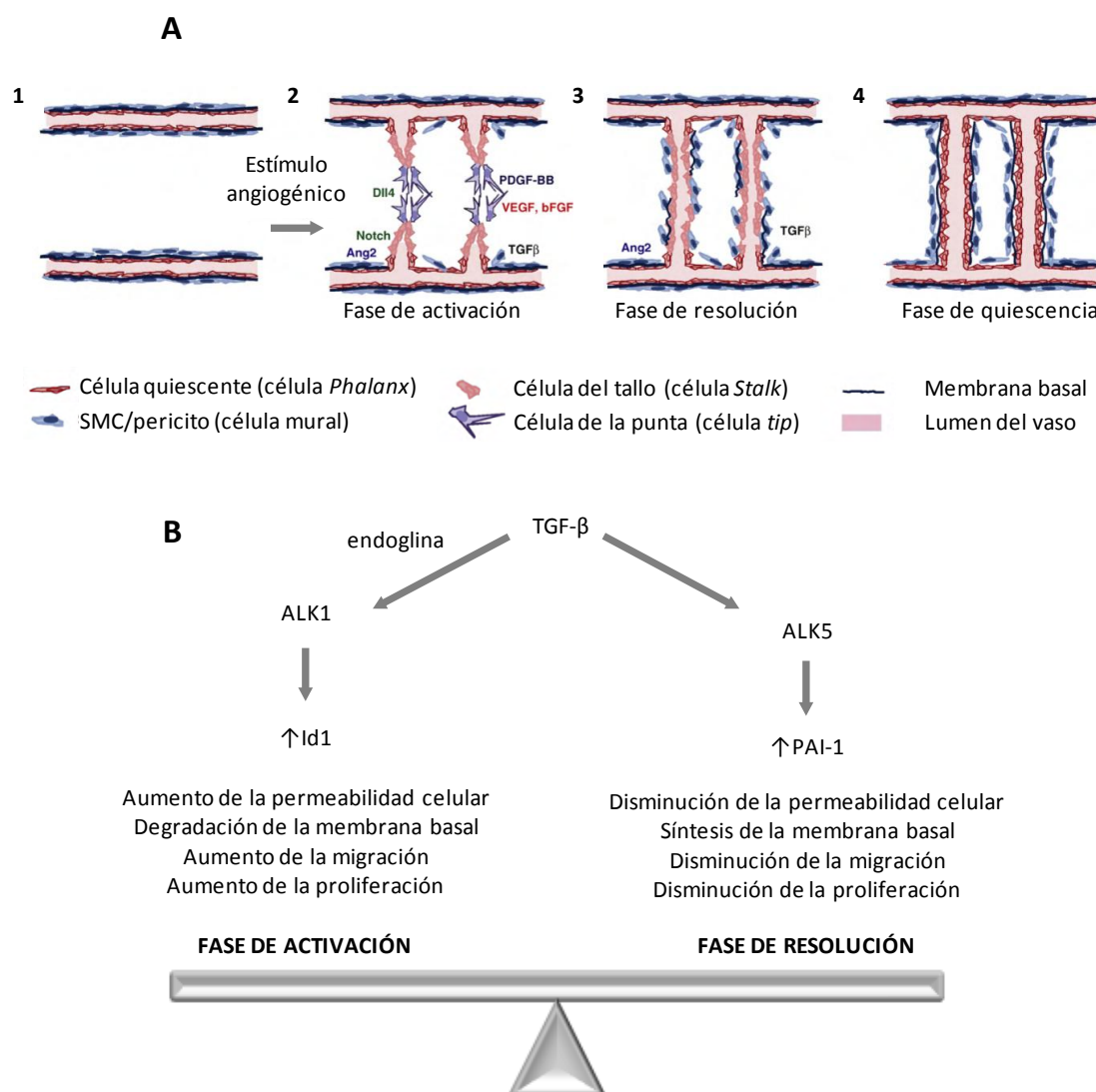
#### 4.3 Balance del estado de activación del endotelio mediante las rutas ALK1/ALK5

Los receptores tipo I y II de TGF- $\beta$  se expresan en células endoteliales y en VSMCs, pero también en muchísimos otros tipos celulares (Goumans y col., 2002; Massague y col., 1990). Pero la peculiaridad que aporta un fino nivel de regulación en la señalización de TGF- $\beta$  en endotelio es el hecho de que coexistan dos receptores tipo I: ALK1 y ALK5.

Actualmente se sabe que el TGF- $\beta$  regula el estado de activación o de quiescencia de las células endoteliales según las necesidades fisiológicas del entorno. Asimismo, se ha observado que el TGF- $\beta$  en el endotelio actúa tanto de modo inhibitorio como estimulador de la angiogénesis *in vitro*, dependiendo de las condiciones experimentales (Pepper 1997; Goumans 2003). Esta dualidad funcional es posible gracias a su capacidad de interaccionar con dos diferentes receptores tipo I con funciones contrapuestas: ALK5 y ALK1 (Roelen, 1997; Oh 2000,

Goumans 2002). Tras la activación del complejo, la señal será transducida por Smad2/3 en el caso de ALK5 y por Smad1/5/8 en el caso de ALK1 (Lebrin y col., 2004). Sin embargo, existe cierta controversia sobre las funciones en las que están implicados ALK5 y ALK1, al ser a veces complicado establecer un límite que separe ambas rutas. La señalización de TGF- $\beta$  mediada por ALK1 induce la fosforilación de Smad1/5/8, lo cual desencadena el estímulo proliferativo para las células endoteliales, su migración y promueve la formación de tubos a partir de éstas (Goumans y col., 2003; Goumans y col., 2002). Entre los genes diana regulados por dicha ruta se encuentran genes implicados en procesos de proliferación como *ID1*, *ID2*, *ENG* y *BMPR-II*, y también otros que son capaces de frenar la ruta como las Smads inhibidoras *SMAD6/MADH6* y *SMAD7/MADH7*. *ID1* es uno de los principales genes regulados por ALK1, cuya cascada de señalización intracelular tiene como resultado la estimulación de la transcripción de *ID1*, y el consiguiente aumento de expresión de la proteína Id1 es requerido para la migración y formación de tubos inducida por TGF- $\beta$ . Además, Id1 inhibe la diferenciación y activa la acción de metaloproteasas que degradan matriz extracelular para favorecer la ramificación de los nuevos vasos en formación (Goumans y col., 2002; Korchynskyi y ten Dijke, 2002; Lux y col., 2006; Ota y col., 2002).

A excepción de un único grupo de investigación que ha descrito efectos inhibidores de migración y proliferación de célula endotelial mediados por ALK1 (Lamouille y col., 2002; Mallet y col., 2006), se considera de modo general a ALK1 como mediador de estímulos proliferativos favoreciendo la fase de activación de angiogénesis (Blanco y col., 2005; Goumans y col., 2003; Goumans y col., 2002; Lux y col., 2006; Suzuki y col., 2010). En contraposición, el TGF- $\beta$  interactuando con ALK5 induce la fosforilación de Smad2/3, dando lugar a un bloqueo de la angiogénesis, inhibiendo la proliferación de las células endoteliales, la formación de tubos y la migración (Goumans y col., 2003; Goumans y col., 2002). ALK5 induce la expresión de fibronectina (*FN1*) y del inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno (*PAI-1*), un regulador negativo de la migración endotelial (Boehm y col., 1999). Además, ALK5 se ha relacionado como un regulador positivo de la permeabilidad vascular y de la remodelación del citoesqueleto. La cadherina endotelial vascular (*VE-Cadh*) promueve la estabilización vascular vía ALK5 (Rudini y col., 2008). Otros genes diana de la respuesta efectora de TGF- $\beta$  mediada por ALK5 son el colágeno 1- $\alpha$ 1 (*COL1A1*) y la óxido nítrico sintasa endotelial (*NOS-3 /eNOS*, *endothelial Nitric Oxide Synthase*) (Goumans y col., 2003). Por todo ello, la señalización de TGF- $\beta$  mediada por ALK5 se considera que es la encargada de mantener el endotelio en un estado quiescente, parando el ciclo celular, y llevando a la célula a un estado de diferenciación en la fase de maduración de la angiogénesis, con la formación de nueva matriz extracelular alrededor del nuevo vaso formado para su estabilización.



**Figura 7. Mecanismos moleculares de la angiogénesis. A. Fases de la angiogénesis.** La angiogénesis se inicia por estímulos como la hipoxia o el daño (medida por VEGF, bFGF o TGF-β) y comprende cuatro fases. La fase de activación se caracteriza por cambios en la forma de la célula endotelial, reordenamiento de las uniones entre ellas, degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, liberación de los pericitos, desestabilización del vaso e incremento en la permeabilidad. Las células endoteliales activadas empiezan a proliferar y migran al espacio perivascular en respuesta al estímulo angiogénico. Durante la fase de resolución, las células endoteliales paran de proliferar y migrar y las SMCs y los pericitos se reclutan al nuevo brote. La membrana basal se reconstituye para asegurar la estabilización y la maduración de los nuevos vasos formados. Finalmente, los vasos quedan en estado quiescente. **B. Esquema del equilibrio de los estados de activación o quiescencia del endotelio mediado por TGF-β a través de las rutas ALK1/ALK5.** El TGF-β regula el estado del endotelio gracias a un fino balance entre las cascadas de señalización mediadas por ALK1 y ALK5. La activación de ALK1 induce la expresión del Inhibidor de la diferenciación 1 (*Id1*) y estimula migración y proliferación de la célula endotelial, mientras que la activación de ALK5 por el TGF-β induce la expresión del inhibidor de la activación del plasminógeno 1 (*PAI-1*), inhibiendo migración y proliferación celular. La relación entre ambas señales determinará si el TGF-β tiene un efecto proangiogénico o antiangiogénico en un determinado contexto celular. Modificado de Pardali y col., 2010 y de Lebrin y col., 2004.

En estudios realizados en ratones se ha visto que, durante el desarrollo embrionario, el patrón de expresión de ALK1 y ALK5 difiere ligeramente para regular estrechamente la señalización mediada por TGF-β con objeto de lograr un controlado proceso vasculogénico.

Mientras que ALK1 se expresa predominantemente en el endotelio arterial, ALK5 se localiza en las tunicas media y adventicia de los vasos, formadas por células musculares lisas y pericitos, pero es indetectable en la túnica íntima o endotelio propiamente dicho (Seki y col., 2006).

Las funciones de ALK1 están relacionadas con el proceso fisiológico contrapuesto al llevado a cabo por ALK5. De este modo la célula endotelial es capaz de programar las distintas etapas de la angiogénesis de un modo organizado en el tiempo, hallándose ambas cascadas de señalización siempre en un balance finamente controlado. ALK1 está implicado en las primeras etapas: crecimiento y proliferación celular, migración y destrucción proteolítica de la matriz extracelular. ALK5 es el encargado de señalizar hacia genes diana implicados en frenar proliferación y migración, y estimular diferenciación y formación de matriz extracelular para estabilizar el vaso. Se considera que los efectos opuestos de ALK1 y ALK5 dependen estrictamente de la dosis y duración de la estimulación por el TGF- $\beta$ , estando la dosis baja y la duración corta del estímulo relacionada con la primera fase y la dosis alta y mayor duración del estímulo con la segunda fase (Lebrin y col., 2004).

#### 4.4 Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

---

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad vascular autosómica dominante caracterizada por la aparición de malformaciones arteriovenosas en la región de contacto entre vénulas y arteriolas, dentro de la red capilar, lo que lleva a su desestructuración y pérdida de funcionalidad. Actualmente es considerada enfermedad rara, ya que su prevalencia es de 1:8.000 en la población española y mundial (Govani y Shovlin, 2009).

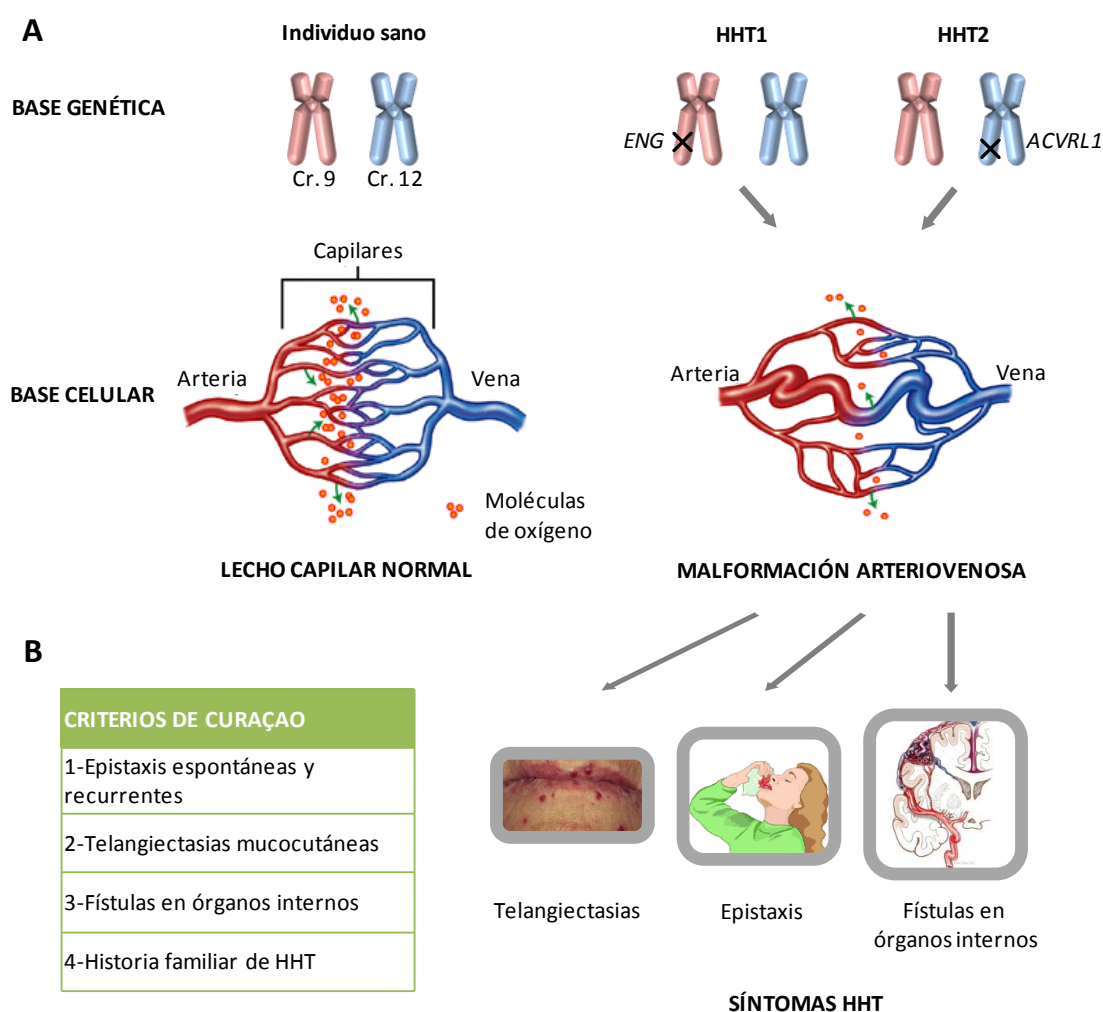
Su diagnóstico se realiza, en principio, atendiendo a criterios clínicos (criterios de Curaçao) (Shovlin y col., 2000), si bien más tarde se debe realizar la confirmación genética. Estos criterios son cuatro: i) aparición de telangiectasias o dilataciones anormales de los vasos sanguíneos que producen manchas rojas en piel y mucosas (principalmente son visibles en labios, lengua y uñas); ii) epistaxis o sangrados nasales abundantes y recurrentes (por la rotura de estas mismas telangiectasias ante la frecuente erosión de la mucosa nasal); iii) aparición de malformaciones arteriovenosas en órganos internos como pulmón, hígado, cerebro, que dan lugar a fístulas y que pueden ser la principal causa de complicación si no son detectados a tiempo; y iv) existencia de historia familiar de la enfermedad. Se considera que un individuo tiene HHT si presenta al menos 3 de los 4 criterios. Los primeros casos de HHT fueron descritos hace más de cien años de forma independiente por tres médicos, Henry J.L.M. Rendu (1896),



William Osler (1901) y Frederick P. Weber (1907), y se le dio el nombre de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria en el año 1909 (Fuchizaki y col., 2003; Hanes, 1909). Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando se demostró que la base de la enfermedad radicaba en mutaciones en un *locus* localizado en la región 9q33-q34.1 (McDonald y col., 1994; Shovlin y col., 1994). Gracias a estudios de hibridación *in situ* se supo que el gen que se encontraba en esa región correspondía a endogлина (*ENG*) (Fernandez-Ruiz y col., 1993). Poco después, se consiguió demostrar que efectivamente era *ENG* el gen mutado en HHT (McAllister y col., 1994), aunque, no obstante, existían muchos pacientes que no presentaban la mutación en *ENG*. Por ello, la búsqueda de un segundo *locus* continuó hasta que se descubrieron más tarde mutaciones en la región cromosómica 12q11-q14, donde se localiza el gen de ALK1 (*ACVRL1*) (Johnson y col., 1996). Eso llevó a la denominación de HHT1 para las mutaciones en *ENG* (Registro de enfermedades hereditarias humanas *online* OMIM 131195) y HHT2 para las mutaciones en *ACVRL1* (OMIM 600376). Hasta la fecha, se han descubierto otros tres *loci* cuya mutación es causante de HHT: mutaciones en *SMAD4/MADH4* son responsables de un síndrome combinado de Poliposis Juvenil y HHT (JPHT) (Gallione y col., 2010) y se ha descrito una asociación entre HHT y mutaciones en regiones de los cromosomas 5 (Cole y col., 2005) y 7 (*locus* 7p14) (Bayrak-Toydemir y col., 2006), cuyos genes todavía no han sido identificados. En cualquier caso, el 90% de los pacientes con HHT diagnosticada clínicamente son del tipo HHT1 y HHT2.

Los pacientes de HHT son heterocigotos para el gen afectado, siendo la situación homocigótica letal. De hecho, los ratones modificados genéticamente para anular la expresión de ambos alelos de *ENG* o *ACVRL1* mueren antes de llegar a término la gestación del feto (días 10,5-11,5). En el caso de *ENG* es debido a defectos angiogénicos en el saco vitelino y cardiovasculares en la formación de las válvulas del corazón incompatibles con la vida (Arthur y col., 2000; Bourdeau y col., 1999; Li y col., 1999), y en el caso de *ACVRL1* a la fusión de los plexos capilares y la hiperdilatación de grandes vasos (Oh y col., 2000). Al presentarse la mutación en heterocigosis en la enfermedad, la proteína normal se expresa un 50%, y por ello se propone un mecanismo de haploinsuficiencia como causa de la enfermedad (Abdalla y Letarte, 2006; Raab y col., 1999). Esto quiere decir que la cantidad de proteína normal sintetizada no es suficiente para realizar las funciones celulares con normalidad. Por lo tanto, en todas las variantes de la enfermedad la base anatomopatológica es la misma: la disfuncionalidad de la señalización del TGF- $\beta$  endotelial hace que el endotelio no se desarrolle con normalidad. Todos los síntomas derivan de malformaciones arteriovenosas que dan lugar a la pérdida localizada de la red capilar, originando conexión directa entre arterias y venas (Abdalla y Letarte, 2006; Fernandez y col., 2006; Guttmacher y col., 1995).





**Figura 8. Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y síntomas clínicos derivados.** La HHT es una enfermedad vascular autosómica dominante que se caracteriza por hemorragias espontáneas y recurrentes. Mutaciones en los genes de *ENG* o *ACVRL1* son en el 90% de los casos la base genética de la enfermedad. La haploinsuficiencia de una de estas dos proteínas es, actualmente, la hipótesis más fiable sobre el mecanismo patogénico. En consecuencia, el balance de la señalización de TGF- $\beta$  en endotelio se desregula, la pared vascular se vuelve frágil, su citoesqueleto se desestructura, y la angiogénesis aumenta de modo descontrolado, dando vasos de morfología aberrante y calibre ensanchado, y perdiéndose la red capilar. La aparición de estas malformaciones arteriovenosas tiene como consecuencia un peor intercambio de oxígeno y nutrientes con los tejidos, da lugar a telangiectasias en piel y mucosas y a fístulas en órganos internos (fundamentalmente en cerebro, hígado, pulmón y tracto gastrointestinal). La rotura de estas frágiles estructuras da lugar a los síntomas, que incluyen sangrados nasales (epistaxis) por rotura debido a la abrasión de la mucosa nasal, detección de telangiectasias y fístulas en órganos internos e historia familiar. El diagnóstico clínico de la enfermedad se realiza en base a estos síntomas según los criterios de Curação, donde se considera que un individuo está enfermo cuando presenta al menos tres de los cuatro criterios, la presencia de dos criterios indica probabilidad y la de un único criterio prácticamente descarta la presencia de la enfermedad. El diagnóstico ha de confirmarse genéticamente.

Además, la observación de que la severidad de los síntomas, la edad de aparición de los mismos y la localización de las lesiones varían mucho entre individuos incluso de una misma familia, ha llevado a hipotetizar recientemente la necesidad de un segundo evento, además de la haploinsuficiencia, que haga aparecer la sintomatología. De hecho, el daño vascular se ha

demostrado como un evento patogénico causante de la aparición de malformaciones arteriovenosas *de novo* en la vasculatura subdérmica de ratones deficientes en ALK1 en edad adulta (Park y col., 2009).

Aunque se han desarrollado múltiples técnicas intervencionistas para la eliminación de las fístulas se trata sólo de soluciones temporales. Además, hasta la fecha los fármacos antifibrinolíticos (tranexámico) y hormonales (raloxifeno) son las únicas terapias paliativas disponibles que aminoran los síntomas de los enfermos de HHT (Albiñana y col., 2010; Fernandez y col., 2007). Por ello, el desarrollo de nuevas terapias que prevengan la aparición de malformaciones arteriovenosas y que estén basadas en los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad son absolutamente necesarias para los pacientes de HHT (Park y col., 2009). En este sentido, el conocimiento de los mecanismos de regulación transcripcional de los genes involucrados en HHT y la evaluación de las posibles estrategias para incrementar la tasa de transcripción pueden ser cruciales para identificar terapias que contrarresten dicha haploinsuficiencia.

## 5 La transcripción. Sp1 como regulador transcripcional

---

El inicio de la síntesis de ARN mensajero es considerado uno de los principales puntos de regulación de la expresión génica en organismos eucariotas. Los factores de transcripción encargados de controlar la síntesis de ARN mensajero por parte de la ARN polimerasa II son los llamados Factores Generales de Transcripción (FGTs). El proceso de inicio de transcripción conlleva tres pasos: inicio del ensamblaje de la maquinaria transcripcional al promotor formando un complejo cerrado, isomerización del complejo cerrado a complejo abierto y avance a través del promotor para comenzar la elongación (Murakami y col., 2002). En el primer paso la ARN polimerasa y sus factores asociados se unen reversiblemente al promotor. En el segundo paso, un tramo de ADN del promotor adquiere estructura relajada y sirve de molde para la transcripción. Finalmente, la polimerasa avanza a través del promotor y se dispone a elongar el transcrito (Aso y col., 1994). La eficiencia de cada paso va sujeta a la regulación llevada a cabo por proteínas activadoras o represoras del proceso. Estos factores de transcripción interaccionan con proteínas del complejo incrementando su afinidad por el ADN y estabilizando al complejo basal de transcripción sobre el promotor.

La expresión de algunos factores moduladores de la transcripción (activadores o represores) está restringida a algunos tipos celulares ya que regulan la expresión de genes

específicos para dicho tejido. En cambio, otros factores se expresan de modo ubicuo y se requieren para la expresión constitutiva o inducible de una gran variedad de genes.

## 5.1 Características de las familias Sp y KLF

---

Las familias Sp (*Specificity proteins*) y KLF (*Krüppel-like factors*) están formadas por factores de transcripción que, de modo más o menos ubicuo, se requieren para la expresión constitutiva o inducible de múltiples genes en el organismo. Al principio se consideraron dentro de una misma familia génica por hallarse grandes homologías con respecto a sus zonas de reconocimiento en el ADN. Posteriormente, el estudio de ambas familias subrayó importantes diferencias que hicieron clasificarlas en el modo que las conocemos hoy.

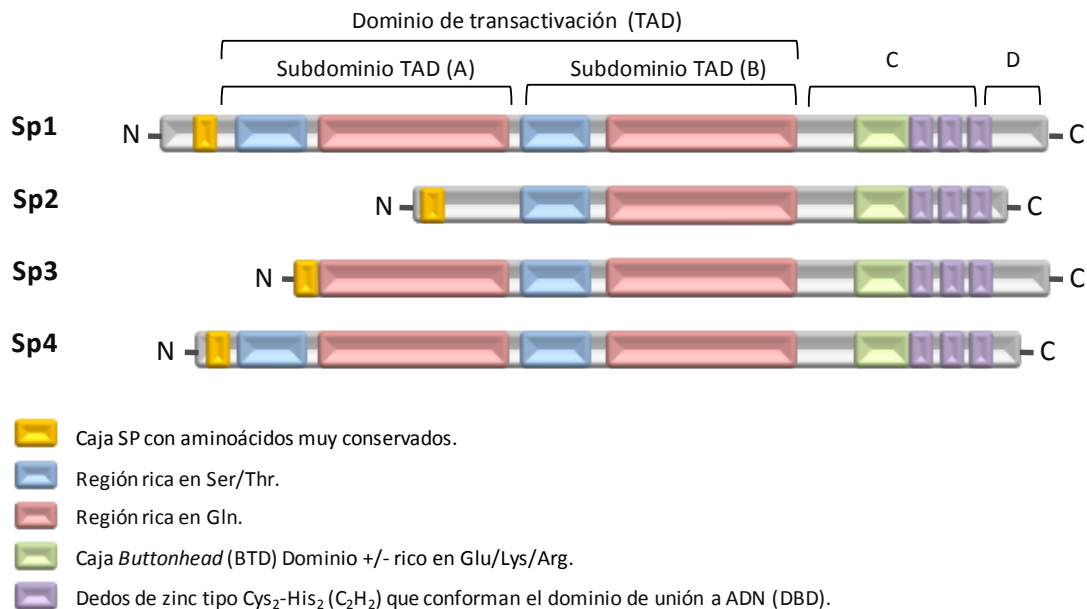
Ambas familias poseen un dominio de unión al ADN (DBD) altamente conservado, con un grado de conservación de secuencia superior al 65%, y tres “dedos de zinc” adyacentes de tipo Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) (Lania y col., 1997; Wierstra, 2008).

La familia Sp tiene preferencia, en general, por cajas GC (ricas en guanina y citosina), y es considerada una familia de transactivadores, si bien, como veremos, algún miembro es capaz de reprimir la actividad activadora de otros miembros de la misma familia. Mientras que la familia KLF es una familia que comprende por igual activadores génicos y represores (Black y col., 2001; Philipsen y Suske, 1999; Turner y Crossley, 1999) y prefiere las cajas GT, si bien algunos miembros de la familia son capaces de reconocer las cajas GC también reconocidas por los factores Sp (Wierstra, 2008).

Una característica esencial de los factores Sp es la presencia de la caja *Buttonhead* (BTD) CXCPXC justo al lado N terminal de los tres “dedos de zinc”. La función de dicha caja es desconocida pero está presente en los homólogos de *Drosophila* (de ellos toma el nombre de *Buttonhead*) y *C.elegans*, sugiriendo que debe tener un papel fisiológico importante. Otra característica de los factores Sp es la presencia de la caja de aminoácidos conservada SP en el extremo N terminal de la proteína. La principal diferencia con los factores KLF es que éstos últimos carecen de la caja BTD, si bien, aparte de la presencia de los tres “dedos de zinc”, hay pocas homologías en el resto de secuencia entre ambas familias (Suske y col., 2005).

Hasta la fecha se han clonado 25 miembros Sp/KLF en humano. La familia Sp se subdivide en los miembros Sp1-4 y Sp5-9, según contengan o no dominios de transactivación (TADs) ricos en glutamina en el extremo amino terminal (Lania y col., 1997; Suske, 1999). Sp1, 3 y 4, poseen dos TADs ricos en glutamina, uniéndose a cajas GC y CT con idéntica (alta o baja) afinidad ambos dominios. Sp2 en cambio sólo tiene un TAD, y no puede unirse a cajas GC. La familia KLF

está compuesta por al menos 16 factores, de los cuales la característica común es la presencia de los mencionados “dedos de zinc”, con 81 aminoácidos muy conservados (Suske y col., 2005).



**Figura 9. Representación esquemática de los dominios funcionales de Sp1 y la comparación con los presentes en otros miembros de la familia.** Los dominios de transactivación son ricos en residuos Ser/Thr y en Gln. Sólo se incluyen unos miembros representativos de la familia, por su similitud entre sí. Los miembros Sp5 - Sp9 muestran mayores diferencias estructurales. Adaptado de Lania y col., 1997.



**Figura 10. Comparación esquemática de los dominios funcionales de los factores más relevantes de la familia KLF expresados en endotelio.** Adaptado de Atkins y Jain, 2007.

## 5.2 Sp1 como regulador transcripcional y mecanismos de transactivación

El factor de transcripción Sp1 es el miembro prototípico de la familia de factores de unión a ADN con “dedos de zinc” tipo  $C_2H_2$ . Puede activar la transcripción en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. Se descubrió inicialmente como factor transactivador selectivo de los promotores temprano y tardío del virus de simios SV40 (Dyan y Tjian, 1983) y desde entonces se han descubierto miles de genes modulados por él, implicados en el control de diversos procesos celulares como el crecimiento celular y la diferenciación (Opitz y Rustgi, 2000), la apoptosis (Kaczynski y col., 2003), la angiogenesis (Mazure y col., 2003) y la respuesta inmune (Jones y col., 1986), entre otros muchos.

Sp1 es una proteína de 785 aminoácidos con un peso molecular de 100-110 kDa, de localización nuclear y regula la expresión génica por múltiples mecanismos. Reconoce motivos ricos en GC de tipo 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' o 5'-(G/T)(G/A)GGCG(G/T)(G/A)(G/A)(C/T)-3' con alta afinidad (Briggs y col., 1986; Kadonaga y col., 1987; Kadonaga y Tjian, 1986) aunque también se une a cajas CT y GT pero con mucha menos afinidad. Posee dos dominios de transactivación (TADs) ricos en glutamina, denominados A y B, los cuales interaccionan directamente tanto con TBP (Proteína de unión a caja TATA) como con la proteína TAF4 (factor 4 asociado a TBP) (Kadonaga y col., 1987). Puede regular la expresión de genes que contengan o no caja TATA vía interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción como Ets1, c-myc, c-Jun, Stat1 y Egr-1 o por interacción directa con la maquinaria de transcripción basal (Tan y Khachigian, 2009).

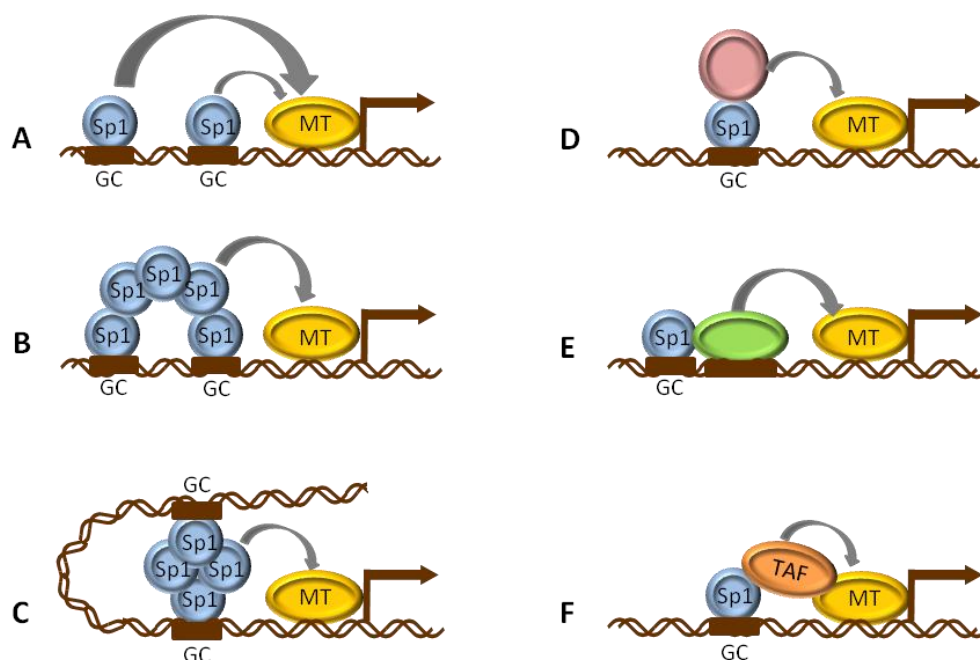
Durante mucho tiempo se pensó que era el único factor capaz de actuar a través de estos sitios, hasta que en el año 1992 se comprobó que pertenecía a una familia de factores capaces de reconocer las mismas zonas génicas enriquecidas en G y C. En ese año se caracterizaron otros tres miembros de la familia: Sp2, Sp3 y Sp4. (Hagen y col., 1992; Kingsley y Winoto, 1992). Sp1 y Sp3 se expresan de modo ubicuo mientras que Sp4 está restringido a algunos tipos celulares cerebrales.

Sp1 es por tanto un transactivador (Courey y Tjian, 1988; Kadonaga y col., 1988). Puede unirse directamente a otras moléculas de Sp1 y formar homo-oligómeros (Matsushita y col., 1998). En principio, puede transactivar por medio de la unión a un único sitio en el ADN (Courey y Tjian, 1988), pero también puede transactivar de modo sinérgico con otras moléculas de Sp1 en dos o más sitios de unión en el ADN, ya sean cercanos o distales entre sí (Yu y col., 2003). Además, puede producir superactivación de la transcripción, cuando ésta va mediada por sí mismo. Para esta superactivación, una molécula de Sp1 se une al ADN donde el

superactivador no lo hace, pero interacciona con la molécula de Sp1 que le sirve de “puente” (Courey y col., 1989; Pascal y Tjian, 1991).

Factor	Proteína	Expresión	Localización cromosómica	Función	Asociación principal	Resultado de la anulación génica en ratón	Referencia
Sp1	90 kDa	Ubicua	12q13	Activador	TAF1C TBP	Letal. Requerido para desarrollo temprano.	(Dylan y Tjian, 1983)
Sp2	70 kDa	Ubicua	17q21.32	Activador	No det.	ND	(Kingsley y Winoto, 1992)
Sp3	97 kDa 60 kDa	Ubicua	2q31	Represor Activador	TAF1C TBP	ND	(Hagen y col., 1992; Kingsley y Winoto, 1992)
Sp4	82 kDa	Cerebral	7p15	Activador	No det.	Requerido para fertilidad masculina	(Hagen y col., 1992)

**Tabla 1. Familia de factores Sp y sus principales características.** Modificado de Lania y col., 1997. TBP, proteína de unión a caja TATA; TAF1C, factor asociado a TBP; ND, no descrito.



**Figura 11. Mecanismos de transactivación mediados por Sp1.** A. Activación simple por unión de Sp1 a sitios independientes. B. Activación sinérgica por multímeros de Sp1. C. Activación sinérgica por unión de Sp1 a sitios proximales y distales. D. Superactivación llevada a cabo por un factor transactivador que usa a Sp1 como puente. E. Activación sinérgica de Sp1 con factores reguladores del crecimiento o específicos de tejido. F. Efecto directo sobre el inicio de transcripción. MT es la maquinaria de transcripción. TAF es el factor asociado a la proteína de unión a caja TATA (TBP).

Hasta la fecha no se ha llegado a una conclusión clara acerca de si la transcripción mediada por Sp1 está finamente regulada en las células de mamífero o si simplemente está determinada por la cantidad de Sp1 presente en el núcleo. En ratón, Sp1 se expresa también ubicuamente pero las distintas células y los distintos momentos del desarrollo influyen hasta el punto de observarse diferencias de hasta cien veces en la cantidad de proteína expresada (Saffer y col., 1991; Saffer y col., 1990). Sp1 puede actuar sólo, pero también de modo combinado con otros factores de transcripción con patrones de expresión temporal o espacialmente más restringidos. Además, las cajas GC suelen con frecuencia encontrarse cerca de sitios de unión para otros factores de transcripción, pudiendo actuar fácilmente en conjunción. Hasta la fecha se han descrito interacciones de Sp1 con Smads (en la regulación conjunta de los promotores de *Col1A2*, *p15*, *p21*, *ENG*) (Botella y col., 2001; Feng y col., 2000; Koutsodontis y col., 2002; Moustakas y Kardassis, 1998; Pardali y col., 2000; Zhang y col., 2000), AP-2, y c-Jun, en términos generales, y también la interacción de factores específicos de tejido como GATA1 en células eritroides y factores inducidos por señales como SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1*) en respuesta a depleción de esteroides (Wierstra, 2008).

Sp1 se une al factor TFIID (Factor iniciador de la transcripción ID) de la maquinaria basal y estimula el inicio de la transcripción. Esta alta afinidad por TFIID explicaría la bien conocida capacidad de Sp1 para inducir la transcripción de los genes que carecen de caja TATA. Sp1 también estabiliza el ensamblaje de TFIIB y TFIIE en el complejo de preiniciación, e indirectamente se ha detectado unido a TFIIA $\alpha$  (Wierstra, 2008).

Es importante tener en consideración que los factores Sp1 y Sp3 exhiben muy similares, si no idénticas, especificidades y afinidades de unión a ADN. Por tanto, compiten por la unión a las mismas cajas GC, o, en su caso, GT o CT. En general, Sp3 reprime la transactivación de promotores mediada por Sp1 cuando hay más de un sitio de unión. Además, Sp1 ejerce un efecto transactivador mucho más potente que el ejercido por Sp3 (Hagen y col., 1994; Li y col., 2004).

### 5.3 Sp1 y remodelación de cromatina

---

Sp1 se une directamente al coactivador transcripcional CBP/p300 a través de su dominio DBD. CBP/p300 acetila a Sp1 y esto hace que se incremente la capacidad de unión de Sp1 al ADN (Suzuki y col., 2000). CBP/p300 es un coactivador ubicuo pero su importancia transcripcional se ha puesto de manifiesto en célula endotelial y en otros tipos celulares relacionados e importantes para la fisiología vascular como las VSMCs que rodean los vasos, y

las células musculares cardíacas. Además, otras proteínas implicadas en la regulación de genes cardiovasculares, como MEF2C (*Myocyte enhancer factor 2C*) y GATA4 también regulan sus genes diana mediante interacción con CBP/p300 (Suzuki y col., 2005). Otra proteína que interacciona con Sp1 y que está relacionada con la remodelación de la cromatina es la histona deacetilasa HDAC1. HDAC1 interacciona con Sp1 y reprime la activación transcripcional mediada por dicho factor (Doetzlhofer y col., 1999). Sp1 interacciona con una chaperona de histonas llamada TAF-I/SET (factor activador de molde-I), que actúa como un represor transcripcional. Esta chaperona es un factor represor transcripcional pero, según el contexto, también puede tratarse de un activador de transcripción de cromatina (Gamble y col., 2005). Además, ha sido descubierta otra interacción de Sp1 con un factor de remodelación de cromatina, el factor SWI/SNF (factor de ensamblaje nucleosomal dependiente de ATP) (Kadam y col., 2000).

Los factores Sp/KLF son, aparte de las histonas, los únicos factores descritos hasta la fecha que interaccionan con los tres tipos de factores implicados en remodelación de cromatina: acetilasas, deacetilasas y factores de ensamblaje nucleosomal. La regulación transcripcional de los genes diana de Sp1 no depende sólo de su efecto transactivador, sino también del estado de compactación de la cromatina, de las remodelaciones que pueda sufrir por la presencia de otros factores, y de sus modificaciones epigenéticas. El mecanismo de interacciones existente entre CBP/p300, HDAC1, TAF-I/SET y SWI/SNF con Sp1 aporta un fino nivel de regulación de la transcripción mediada por dicho factor en el contexto cardiovascular (Suzuki y col., 2005).

Otro de los mecanismos fundamentales de regulación transcripcional a nivel epigenético descubierto en los últimos años es la metilación de islas CpG (regiones ricas en GC) de los promotores génicos (Siegfried y col., 1999). Se ha observado que Sp1 puede evitar directa o indirectamente la metilación de islas CpG (Brandeis y col., 1994; Macleod y col., 1994). A su vez, la metilación en elementos GC puede interferir con la unión de Sp1 (Clark y col., 1997). Las islas CpG de genes de expresión ubicua están no metiladas en todos los tipos celulares. Las células embrionarias, al contrario que las somáticas, protegen a las islas CpG de la metilación a través de factores específicos que bien impiden la metilación del ADN o lo desmetilan activamente. En cambio, la metilación de citosinas en sitios Sp1 está relacionada con el silenciamiento de la expresión de algunos genes específicos de tejido en otros tipos celulares distintos al propio (Cao y col., 2000). En modelos de animal transgénico en los que se han introducido mutaciones en sitios Sp1 en un determinado promotor se ha observado una metilación *de novo* en dicho promotor (Macleod y col., 1994). Por lo tanto, Sp1 parece ser uno de los factores responsables para establecer un correcto patrón de metilación genómico, necesario para regular la expresión génica basal en el organismo.



## 6 Papel de la familia *Krüppel-Like* en la biología endotelial.

---

### 6.1 Características de la familia KLF

---

Los factores KLF tienen diferentes papeles reguladores que son clave en la diferenciación celular y el desarrollo de tejidos. Los estudios de los últimos años revelan además que esta familia de factores juega un papel crucial en la biología vascular.

El nombre se lo deben a su homología con el dominio de unión a ADN de la proteína *Krüppel* de *Drosophila*, cuyo nombre procede a su vez del término alemán *Krüppel*, en inglés “cripple”, que significa “mutilado”. Los embriones homocigotos de *Drosophila* con el gen *Krüppel* anulado tienen alteraciones en los segmentos abdominal anterior y torácico y presentan un fenotipo letal (Preiss y col., 1985).

El primer miembro de la familia KLF caracterizado en mamíferos fue hallado en glóbulos rojos, se denominó KLF eritroide o KLF1/EKLF y se relacionó con la síntesis de  $\beta$ -globina en el desarrollo eritroide (Miller y Bieker, 1993). Desde ese descubrimiento en 1993 se han descubierto otros 15 miembros de la familia, y su numeración se ha ido haciendo según su aparición cronológica.

Como rasgo característico, el espacio entre “dedos de zinc” en la familia KLF contiene una secuencia de siete aminoácidos altamente conservada: TGEKP(Y/F)X (Dang y col., 2000) y muchos KLFs son capaces de unirse a secuencias de ADN similares como la CACCC o las cajas GT. Esta promiscuidad se explica porque sólo tres residuos críticos de cada “dedo de zinc” determinan el reconocimiento. Además, los dominios en “dedo de zinc” están altamente conservados pero no así los dominios que no se unen al ADN. La transcripción de los KLFs está mediada por sus dominios de activación y represión indicados en la Figura 10.

### 6.2 KLFs en endotelio

---

Hasta la fecha, se ha hallado expresión de tres miembros de la familia KLF en endotelio: KLF2, KLF4, KLF6 (Botella y col., 2002; Kojima y col., 2000; Kuo y col., 1997; Yet y col., 1998).

KLF2 se denominó en un principio LKLF (*lung Krüppel-like factor*) debido a su abundante expresión en pulmón, donde se encarga de regular el desarrollo. Además se expresa en células endoteliales y en timocitos, donde dirige la maduración, programa la quiescencia y regula el tráfico de linfocitos T (Carlson y col., 2006). Los ratones con la expresión génica anulada (*knock*

out) de KLF2 mueren debido al anormal desarrollo del pulmón, lo cual revela el importante papel que juega en este punto (Wani y col., 1998; Wani y col., 1999), y los fetos mueren de hemorragia intraamniótica e intraembrionaria, si bien los *knock out* específicos de endotelio mueren por un fallo cardíaco en el estado embrionario asociado a una profunda pérdida de resistencia vascular periférica. Regula genes endoteliales implicados en: la adhesión de leucocitos al endotelio, la función trombótica de la célula endotelial, el tono vascular y la vasorreactividad (Atkins y Jain, 2007).

KLF4 también se conoce como GKLF (*gut-enriched Krüppel-like factor*, al estar presente en intestino) o proteína epitelial con “dedos de zinc” (EZF, *epithelial zinc-finger protein*), y son estos dos tejidos donde se halló por primera vez (Garrett-Sinha y col., 1996; Shields y col., 1996). Su relación con endotelio se puso de manifiesto al ser clonado de una librería endotelial (Yet y col., 1998), y se ha demostrado que, al igual que KLF2, la expresión de KLF4 se induce por el flujo sanguíneo (McCormick y col., 2001). KLF4 es un regulador de la activación endotelial en respuesta a inflamación (Hamik y col., 2007). La sobreexpresión de KLF4 en células endoteliales disminuye la adhesión de células inflamatorias a las mismas y prolonga el tiempo de coagulación bajo estímulo inflamatorio.

KLF6 también se expresa en endotelio. Sus funciones están relacionadas con la motilidad endotelial (Das y col., 2006), pero fundamentalmente es un factor de respuesta a daño.

### 6.3 KLF6 en relación con el daño endotelial.

---

KLF6 se conoce también con los nombres COPEB (*Core Promoter Element Binding Protein*), GBF (*GC-rich sites binding factor*) y Zf9. Fue clonado independientemente en hígado, placenta y leucocitos (Koritschner y col., 1997; Lalazar y col., 1997; Ratzu y col., 1998; Suzuki y col., 1998). Lo primero que se observó fue la rápida inducción de KLF6 durante la activación de las células esteladas hepáticas en el proceso de fibrogenesis característica de la patología hepática, implicando a este factor como factor clave en la respuesta ante el daño celular (Lalazar y col., 1997; Ratzu y col., 1998).

En las células endoteliales, KLF6 activa al factor uPA (*urokinase plasminogen activator*), concatenando la activación del TGF- $\beta$ 1 latente (Kojima y col., 2000). El factor uPA es un factor enzimático implicado en la remodelación tisular, en la metástasis tumoral y en la apoptosis (Werb, 1997). En respuesta al daño vascular, KLF6 interacciona con Sp1 y transactiva el promotor de *ENG* de forma cooperativa (Botella y col., 2002). Endoglin está implicada en el desarrollo cardiovascular, en el remodelado de los vasos y su expresión es inducida tras daño

vascular (Botella y col., 2002). Como ya hemos mencionado, recientemente se ha demostrado el papel de KLF6 en la motilidad endotelial (Das y col., 2006). La activación del receptor farnesoide X (FXR) impide la formación del complejo represor KLF6/Sp2 sobre el promotor de la metaloproteasa 9 de matriz extracelular (MMP9), lo cual resulta en un incremento de expresión de dicha MMP9. Esto tiene como consecuencia la regulación de la migración endotelial, un paso fundamental en el proceso de remodelación vascular y reparación ante el daño (Das y col., 2006).

Por lo tanto, todos los datos recogidos sobre KLF6 hasta la fecha le adjudican un papel muy importante en el desarrollo vascular, siendo protagonista de los procesos de reparación y remodelación vascular ante el daño.

## **7 Adaptación a bajas condiciones de presión de oxígeno en el medio endotelial**

---

En mamíferos, el desarrollo de los sistemas cardiovascular, hematopoyético y respiratorio suministra un medio para capturar oxígeno del ambiente y distribuirlo a todas las células del organismo para ser utilizado como sustrato necesario en la fosforilación oxidativa y otras reacciones bioquímicas esenciales. Una situación de hipoxia puede resultar en el fallo en la generación de suficiente ATP que mantenga las funciones celulares esenciales, mientras que una situación de hiperoxia resultaría en la generación de especies reactivas de oxígeno que dañarían potencialmente las membranas celulares y el ADN. Por lo tanto, las concentraciones celulares de oxígeno han de estar finamente reguladas en un rango fisiológico muy estrecho.

La concentración normal de O<sub>2</sub> a la que están expuestas las células es de aproximadamente un 20%. Si un tejido es sometido a una hipoxia crónica debido a una enfermedad genética o bien a una hipoxia aguda, generalmente producida por una isquemia, puede sufrir alteraciones muy graves que varían desde la atrofia hasta el infarto o la necrosis del tejido. Para evitarlo, el organismo dispone de sistemas que detectan el estímulo hipóxico generando una cascada de respuestas que tratan de restaurar la homeostasis tisular, adaptándose de este modo a la hipoxia, siempre que no sea extrema. Además, la hipoxia es un estímulo natural ante la necesidad de crear nuevos vasos, por ejemplo durante la gestación, y es el mecanismo aprovechado por las células tumorales para crear vasos con los que nutrirse.

Aunque las respuestas adaptativas a la hipoxia ocurren mediante diferentes mecanismos moleculares, un factor crítico en la regulación de la homeostasis de oxígeno tanto celular como sistémica durante la vida pre y postnatal es el factor de transcripción HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). Su función principal es la inducción transcripcional de una serie de genes implicados

en angiogénesis, metabolismo del hierro, metabolismo de la glucosa, proliferación celular y supervivencia.

### 7.1 HIF-1 $\alpha$ como factor transcripcional mediador del estímulo hipóxico

La familia de HIF es una familia de factores de transcripción que responde a cambios en la presión de oxígeno del entorno celular. HIF-1 es un heterodímero que contiene una subunidad expresada constitutivamente llamada HIF-1 $\beta$  (de 91-94 kDa) y una subunidad que es la verdaderamente regulada por los niveles de oxígeno: HIF-1 $\alpha$  (o sus parálogos HIF-2 $\alpha$  ó HIF-3 $\alpha$ ; de 120-130 kDa) (Ke y Costa, 2006). La subunidad HIF-1 $\beta$  también es denominada ARNT ó *aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* ya que originalmente fue identificada como una proteína de unión del receptor aril-hidrocarbonado (Reyes y col., 1992). Ambas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de HIF pertenecen a la familia de proteínas de unión a ADN conocidas como bHLH-PAS (*basic Hélix-Loop-Hélix-Per/ARNT/Sim*) porque contienen dominios básicos hélice-bucle-hélice y dominios PAS (acrónimo referido a las proteínas PER/ARNT/SIM, en las que fue hallado dicho dominio por primera vez). El dominio bHLH media la dimerización y las propiedades de unión al ADN mientras que el dominio PAS es un dominio adicional de dimerización. Como mínimo, cada miembro de la familia contiene un dominio bHLH en el extremo N terminal precediendo a un dominio PAS (Wang y col., 1995). La región básica, situada en sentido 3' inmediatamente posterior, es la que permite la unión específica a la secuencia de ADN que forma el elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Dos dominios transactivadores en los extremos amino y carboxilo terminales (N-TAD y C-TAD respectivamente) han sido también identificados (Ruas y col., 2002). Se ha demostrado que el dominio C-TAD interacciona con coactivadores como CBP/p300 para estimular la transcripción de diversos genes (Lando y col., 2002a). También posee un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) que es el que regula la estabilidad de la proteína (Pugh y col., 1997).

	SUBUNIDADES $\alpha$	SUBUNIDADES $\beta$
	HIF-1 $\alpha$	HIF-1 $\beta$ /ARNT
	HIF-2 $\alpha$ /EPAS	ARNT2
	HIF-3 $\alpha$	ARNT3
	HLF	
	HRF	
	MOP2	

**Tabla 2. Miembros de la familia de factores inducidos por hipoxia dentro de los factores de transcripción bHLH-PAS.** Cada subunidad  $\alpha$  puede dimerizar con cualquier subunidad  $\beta$  y viceversa. EPAS, Factor PAS endotelial; HLF, Factor similar a HIF (*HIF like factor*); HRF, Factor relacionado con HIF; MOP2, Miembro de la superfamilia PAS 2 (*Member Of PAS Superfamily 2*). Adaptado de Semenza, 1999.

Diagrama de la estructura de los factores de transcripción HIF-1α, HIF-2α/EPAS, HIF-3α, IPAS y HIF-1β.

El diagrama muestra la organización de los dominios de cada proteína, dividida en dos regiones principales: **Dimerización y unión al ADN** y **Transactivación y regulación**.

Las proteínas representadas son:

- HIF-1α**: Incluye dominios bHLH (NLS-N), PAS (A y B), ODDD (p402), TAD (p564, N), ID, NLS-C y TAD (C).
- HIF-2α/EPAS**: Incluye dominios bHLH, PAS (A y B), ODDD (P), TAD (P) y dominios de transactivación amino y carboxi-terminales.
- HIF-3α**: Incluye dominios bHLH, PAS (A y B), ODDD (P), TAD (P) y dominios de transactivación amino y carboxi-terminales.
- IPAS**: Incluye dominios bHLH, PAS (A y B), ODDD (P), TAD (P) y dominios de transactivación amino y carboxi-terminales.
- HIF-1β**: Incluye dominios bHLH, PAS (A y B) y dominios de transactivación amino y carboxi-terminales.

La leyenda define los colores de los dominios:

- Domino básico hélice-giro-hélice.
- Domino *Per/ARNT/Sim* (PAS).
- Repeticiones A y B del dominio PAS.
- Domino de degradación dependiente de oxígeno.
- Domino de transactivación amino y carboxi-terminales.

**Figura 12. Dominios funcionales de HIF-1 $\alpha$  y comparación entre los distintos miembros de la misma familia.** Las tres subunidades HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$ /3 $\alpha$  así como la subunidad HIF-1 $\beta$  (ARNT) contienen dominios básicos hélice-giro-hélice (bHLH) y PAS (con repeticiones A y B). Además, poseen señales de localización nuclear (NLS) en sus extremos terminales amino y carboxilo, dominios de transactivación (TAD) y un dominio de degradación dependiente de la presencia de oxígeno (ODDD). Se muestran en la figura los residuos de prolina (P) susceptibles de ser hidroxilados y que son responsables de la degradación de HIF por el proteasoma. En el caso de HIF-3 $\alpha$ , el procesamiento alternativo indicado da lugar a IPAS, dominante negativo. No se muestra el resultado del procesamiento alternativo de HIF-1 $\beta$ . Adaptado de Semenza GL, 1999 y Costa M y Ke Q, 2006.

31

glicolisis, que son las principales armas para la rápida respuesta ante la deficiencia de oxígeno, y la angiogénesis, que constituye la respuesta a largo plazo (Semenza, 1998). Hoy en día se sabe que HIF-1 $\alpha$  es un factor de transcripción dependiente de la secuencia de ADN, que reconoce sitios consenso de tipo 5'-RCGTG-3' (Mole y col., 2009; Semenza y col., 1996) y que aumenta la expresión de más de 60 genes en respuesta a una disponibilidad baja de oxígeno (Manalo y col., 2005; Semenza, 2010).

## 7.2 HIF-2 $\alpha$

---

Poco tiempo después de la caracterización de HIF-1 $\alpha$ , se identificó y clonó una proteína íntimamente relacionada, a la que se llamó proteína endotelial PAS (EPAS), *HIF-like factor* (HLF), *HIF-related factor* (HRF) e incluso Miembro de la Superfamilia PAS 2 (MOPS2). Más conocida como HIF-2 $\alpha$ , comparte el 48% de la secuencia aminoacídica con HIF-1 $\alpha$ , y por tanto posee grandes similitudes estructurales y bioquímicas, como la heterodimerización con HIF-1 $\beta$  y la capacidad de unirse a HREs. En cambio, en contraste con HIF-1 $\alpha$ , no es una proteína ubicuamente expresada, sino que se encuentra principalmente en pulmón, endotelio, y cuerpo carotídeo (Semenza, 1999). Pese a la gran afinidad de unión que HIF-2 $\alpha$  presenta por múltiples promotores, se ha visto que contribuye a la modulación transcripcional en respuesta a hipoxia aguda de un número muy escaso de estos genes (Mole y col., 2009). Por tanto, hoy en día sigue considerándose a HIF-1 $\alpha$  como el principal responsable de la modulación transcripcional de genes diana en respuesta a hipoxia.

## 7.3 HIF-3 $\alpha$

---

Este tercer miembro de la familia ha sido descubierto más recientemente. Se expresa en gran variedad de tejidos, dimeriza con HIF-1 $\beta$ , y se une a HREs. Está involucrado en la respuesta adaptativa a la hipoxia. Es interesante resaltar que hay una variante de HIF-3 $\alpha$  (la variante 4 procedente de un procesamiento alternativo) con actividad inhibidora (Hara y col., 2001; Maynard y col., 2005). Esta proteína, denominada IPAS, se expresa predominantemente en células de Purkinje en el cerebelo y epitelio corneal. IPAS no posee actividad de transactivación endógena y es capaz de interaccionar con la región amino-terminal de HIF-1 $\alpha$  impidiendo su unión al ADN, actuando por tanto como un regulador dominante negativo de la función de HIF-1 $\alpha$ . La hipoxia induce regulación a la baja de IPAS, permitiendo la activación de HIF-1 $\alpha$ , si bien IPAS también se induce por hipoxia en corazón y pulmón, actuando como

sistema de retroalimentación negativo para la actividad de HIF-1 en estos tejidos (Semenza, 1999).

#### 7.4 La regulación de HIF-1 $\alpha$ y sus parálogos.

---

HIF-1 $\alpha$  está expresado de modo constitutivo en la mayoría de tipos celulares. En respuesta a la hipoxia, sus niveles de inducción transcripcional son leves y transitorios, siendo el aumento de ARNm prácticamente indetectable, pero sus niveles de proteína se elevan bruscamente. Tras esa rápida activación, la vida media de la proteína es de unos escasos 5 minutos. Esto se debe a la estrecha regulación a la que está sometida por los niveles de oxígeno. La transcripción y la síntesis de HIF-1 $\alpha$  apenas resultan modificadas por dichos niveles. El mecanismo está relacionado con la degradación de la misma. En normoxia, HIF-1 $\alpha$  es velozmente degradado, resultando prácticamente indetectable (Wang y col., 1995). Durante una situación de hipoxia, se estabiliza y se transloca del citoplasma al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 $\beta$ , y el complejo formado se transforma en transcripcionalmente activo (Huang y col., 1996; Kallio y col., 1997). Este complejo reconoce los HRE en los promotores de los genes diana, dónde induce la transcripción de dichos genes con la colaboración de ciertos coactivadores (Lando y col., 2002b).

Diversos mecanismos postraduccionales son los encargados de regular la degradación de HIF-1 $\alpha$ : hidroxilación, ubiquitinación, acetilación y fosforilación. Pero es la hidroxilación el evento que juega un papel más relevante en su regulación (Brahimi-Horn y col., 2005). En normoxia, las altas concentraciones de oxígeno (20% O<sub>2</sub>) favorecen la hidroxilación de dos residuos de prolina y la acetilación de un residuo lisina en el dominio ODDD, promoviendo la interacción de HIF con el complejo E3 ubiquitina-ligasa de von Hippel-Lindau (VHL) (Masson y col., 2001; Srinivas y col., 1999). Ese complejo marca a HIF con una serie de moléculas de ubiquitina, que son inmediatamente reconocidas por la subunidad 26S del proteasoma. Además, la hidroxilación de un residuo asparragina del dominio de transactivación carboxi-terminal (C-TAD) impide la asociación de HIF-1 $\alpha$  con CBP/p300 inhibiendo su actividad (Lando y col., 2002b).

Las enzimas encargadas de la hidroxilación de HIF son las prolil-hidroxilasas (PHD).

### 7.4.1 Prolil-hidroxilasas

Las dioxigenasas de HIF-1 $\alpha$  en humanos se denominan *prolyl-hydroxylase domain* (PHD), *HIF-prolyl-hydroxylases* (HPH), or *Egg-laying Nine* (EGLN). Se han caracterizado tres isoformas: PHD1/HPH3/EGLN2, PHD2/HPH2/EGLN1 y PHD3/HPH1/EGLN3 (Bruick y McKnight, 2001; Epstein y col., 2001; Huang y col., 2002). Las tres comparten características bioquímicas entre sí: requieren O<sub>2</sub> y 2-oxo-glutarato como sustratos para la hidroxilación, así como Fe<sup>2+</sup> y ascorbato como cofactores (Schofield y Zhang, 1999).

En presencia de oxígeno, las PHDs son activas e hidroxilan los residuos prolina de HIF-1 $\alpha$ . En este proceso, la molécula de O<sub>2</sub> se separa en dos átomos de oxígeno de los cuales uno se transfiere a la prolina del sustrato y el otro reacciona con el 2-oxo-glutarato para generar succinato y CO<sub>2</sub> (Bruick y McKnight, 2001; Masson y Ratcliffe, 2003). La reacción se representa en la Figura 13. Las prolinas hidroxiladas en HIF-1 $\alpha$  son las localizadas en las posiciones 402 y 564 del llamado “dominio sensible a oxígeno” ODDD (Masson y Ratcliffe, 2003; Masson y col., 2001; Srinivas y col., 1999). Los dos residuos de prolina están conservados en HIF-2 $\alpha$ , y HIF-3 $\alpha$  (en ellos corresponden a las posiciones 405 y 530), y ambos residuos forman parte de una secuencia consenso LXXLAP, que es la misma en todas ellas excepto en la segunda prolina de HIF-3 $\alpha$ , que se cambia por LXXLHP (Bruick y McKnight, 2001; Masson y col., 2001). Ambas prolinas hidroxiladas constituyen la señal de reconocimiento para la unión de VHL. Este factor ubiquitina a HIF-1 $\alpha$  y eso produce su degradación (Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001). La mutación de ambas prolinas impide la interacción de HIF con VHL e incrementa su estabilidad en presencia de niveles normales de oxígeno, mientras que la mutación de cada prolina individualmente estabiliza HIF-1 $\alpha$  sólo parcialmente (Masson y col., 2001).

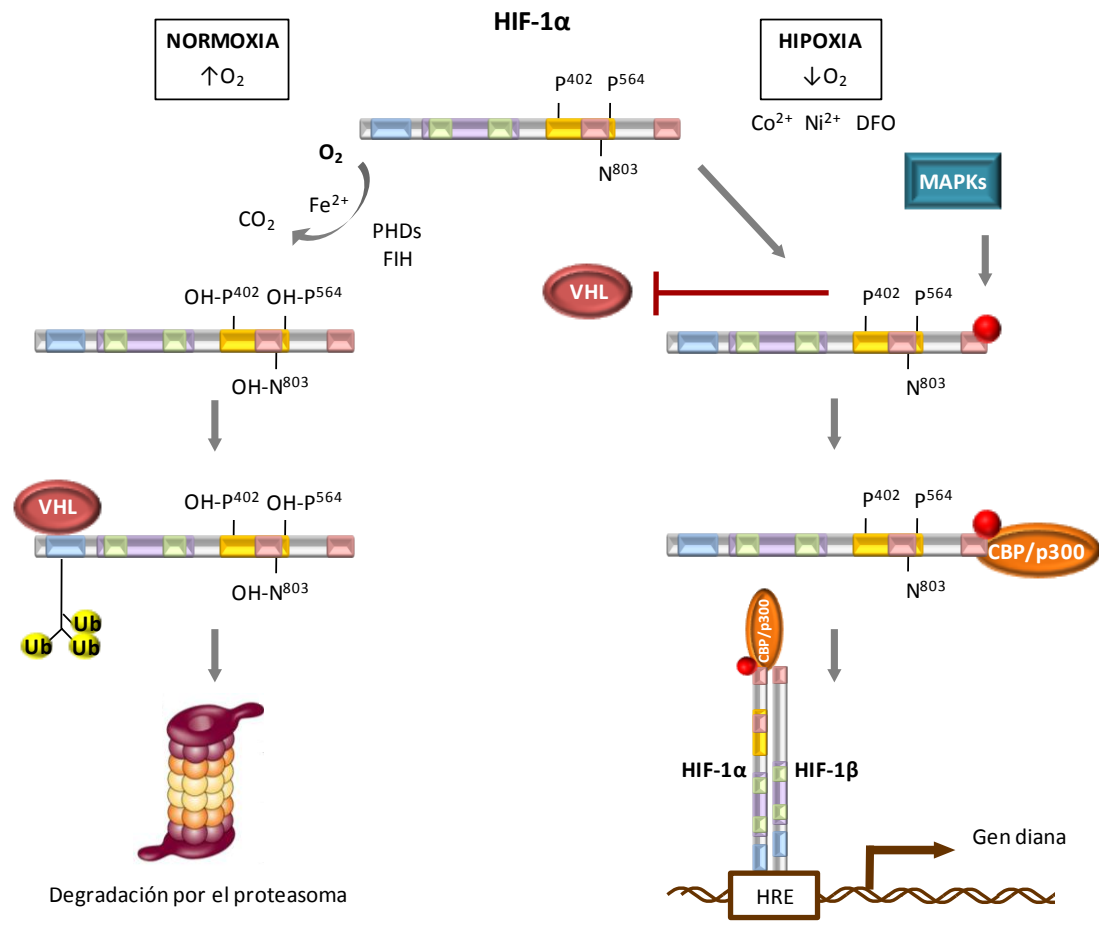
En cambio, las bajas concentraciones de oxígeno durante la hipoxia no permiten la funcionalidad de la actividad enzimática de las PHDs, y HIF-1 $\alpha$  se estabiliza acumulándose en la célula, y estimulando sus genes diana. El indiscutible requerimiento de oxígeno como sustrato para las PHDs hace que sean conocidas como los “sensores de oxígeno” de la célula.

El requerimiento de Fe<sup>2+</sup> se evidencia ya que los quelantes de hierro y algunos metales como Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> son capaces de estabilizar HIF-1 $\alpha$ , mimetizando el efecto de la hipoxia, probablemente por disminuir la disponibilidad del Fe<sup>2+</sup> para la enzima o por sustituirle en su sitio de unión (Masson y Ratcliffe, 2003; Yuan y col., 2003).

Las actividades de las tres isoformas *in vitro* siguen la siguiente gradación: PHD2 >> PHD3 > PHD1. *In vivo* parece ser PHD2 la enzima clave que controla el recambio de HIF-1 $\alpha$  (Huang y col., 2002). El silenciamiento de PHD2 mediante ARN pequeño de interferencia (siARN)



específico es suficiente para estabilizar HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia, mientras que la interferencia de PHD1 o PHD3 no consigue los mismos efectos (Berra y col., 2003).



**Figura 13. Mecanismo de regulación de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en respuesta a hipoxia.** En normoxia, las altas concentraciones de  $O_2$  celular activan a las prolin-hidroxilasas (PHDs) y sirven como sustrato para la hidroxilación de dos residuos de prolina de HIF-1 $\alpha$  (P<sup>402</sup> y P<sup>564</sup>). Asimismo, una asparagina (N<sup>803</sup>) es hidroxilada por FIH (Factor inhibidor de HIF). Este proceso es dependiente de  $O_2$ , y también de oxoglutarato y  $Fe^{2+}$ , que actúa como cofactor. Los residuos hidroxilados son reconocidos por una ubiquitina-ligasa de tipo E3, el factor de von Hippel Lindau (VHL), que marca a HIF-1 $\alpha$  con residuos de ubiquitina, lo que conlleva a la degradación de HIF-1 $\alpha$  por el proteasoma. La hipoxia celular inhibe este proceso, al carecer las PHDs de  $O_2$  que les sirva de sustrato. Además, cualquier mecanismo que inhiba las PHD tendrá el mismo resultado que la hipoxia celular, es decir, una falta de degradación de HIF-1 $\alpha$  un aumento en sus concentraciones celulares. Este es el caso de la presencia en el medio de quelantes de  $Fe^{2+}$ , como la desferrioxamina (DFO) o de otros cationes que puedan desplazar su unión al centro activo de las PHD, bloqueándolas, como es el caso de  $Ni^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . Cuando no hay degradación y el número de moléculas de HIF-1 $\alpha$  se empieza a acumular en la célula, éste se une a la subunidad HIF-1 $\beta$  y a otros coactivadores, reconociendo los promotores de genes diana en el ADN y uniéndose a ellos para modificarlos en función de las necesidades de la célula en respuesta a ese estímulo hipóxico. La fosforilación de HIF-1 $\alpha$  en su extremo carboxi-terminal por las quinasas dependientes de mitógenos (MAPKs) sirve para su reconocimiento y cooperación con el factor de transcripción CBP/p300.

Durante hipoxia, tanto PHD2 como PHD3 aumentan sus niveles de ARNm y proteína, no así PHD1 (Epstein y col., 2001; Metzen y col., 2003). Además, las ligasas E3 específicas de PHD1 y PHD3, Siah-1 y Siah-2, también se regulan al alza transcripcionalmente durante la hipoxia, aumentando la degradación de ambas PHDs por el proteasoma (Nakayama y Ronai, 2004).

La localización de estas PHD, bajo condiciones de sobreexpresión por transfección, es eminentemente citoplasmática para PHD2, nuclear para PHD1 y en ambos compartimentos para PHD3 (Metzen y col., 2003). A pesar de esta localización primaria de PHD2 en el citoplasma, es capaz de circular entre citoplasma y núcleo, contribuyendo a la degradación de HIF-1 $\alpha$  en ambos compartimentos. Aunque las tres enzimas están ampliamente expresadas en muchos tejidos, están sobreexpresadas de modo específico en algunos. PHD2 se localiza abundantemente en tejido adiposo (Oehme y col., 2002), PHD3 en corazón y placenta (Lieb y col., 2002; Oehme y col., 2002) y PHD1 en los testículos (Lieb y col., 2002).

## 7.5 Genes diana de HIF-1 $\alpha$ .

---

Las células y tejidos del organismo, así como los diferentes órganos en conjunto, necesitan adaptarse a los cambios de oxígeno en el medio, para favorecer su supervivencia ante condiciones adversas.

En este contexto, no es sorprendente que una inmensa variedad de genes sean diana de HIF-1 $\alpha$  y estén regulados de un modo específico de tejido. Hasta la fecha se han descrito más de cien genes modulados por HIF-1 $\alpha$ , implicados en funciones muy variadas.

Además, experimentos de sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  en paralelo a hipoxia sobre células arteriales endoteliales seguidos de análisis con micromatrices de ADN demuestran que los principales genes aumentados son colágenos y enzimas modificadoras del colágeno, oxidorreductasas, factores de crecimiento y citoquinas, receptores de membrana y factores de transcripción. Dentro de los reprimidos se encuentran factores generales de transcripción, metabolismo del ARN, ubiquitinación, ciclo celular, replicación, polimerasas, etc. (Manalo y col., 2005). En la Tabla 3 se muestra una selección de los genes diana regulados por HIF-1 $\alpha$  más relevantes:

FUNCIÓN	GEN	
Eritropoyesis y metabolismo del $Fe^{2+}$	Eritropoyetina (EPO) Transferrina (TF) Receptor de transferrina (TFR) Ceruloplasmina Receptor de eritropoyetina (EPOR)	(Sanchez-Elsner y col., 2004; Semenza y col., 1991) (Rolfs y col., 1997) (Bianchi y col., 1999; Lok y Ponka, 1999) (Mukhopadhyay y col., 2000) (Beleslin-Cokic y col., 2004)
	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) VEGF derivado de glándula endocrina (EG-VEGF) Leptina (LEP) TGF- $\beta$ 3 Endoglin (ENG)	(Levy y col., 1995; Sanchez-Elsner y col., 2001) (LeCouter y col., 2001) (Grosfeld y col., 2002) (Scheid y col., 2002) (Sanchez-Elsner y col., 2002)
Tono vascular	Óxido nítrico Sintasa 2 (NOS2) Hemooxigenasa 1 Endotelina 1 (ET1) Adrenomedulina (ADM) Receptor $\alpha$ 1B adrenérgico	(Melillo y col., 1995) (Lee y col., 1997) (Hu y col., 1998) (Nguyen y Claycomb, 1999) (Eckhart y col., 1997)
Metabolismo de la matriz extracelular	Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) Receptores activadores del plasminógeno e inhibidores (PAIs) Prolil-hidroxilasa del colágeno	(Ben-Yosef y col., 2002) (Kietzmann y col., 1999) (Takahashi y col., 2000)
Metabolismo de la glucosa	Adenilatoquinasa 3 Aldolasas A y C (ALDA ALDC) Anhidrasa carbónica 9 Enolasa 1 (ENO-1) Transportadores de glucosa 1 y 3 (GLU1, GLU3) Gliceráldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH) Hexoquinasas 1 y 2 (HK1, HK2) Lactato deshidrogenasa A (LDHA) Piruvatoquinasa M (PKM) Fosfofructoquinasa L (PFKL) Fosfogliceratoquinasa 1 (PGK1) 6-Fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfato-3 (PFKFB3)	(O'Rourke y col., 1996) (Semenza y col., 1996) (Wykoff y col., 2000) (Semenza y col., 1996) (Chen y col., 2001) (Graven y col., 1999) (Mathupala y col., 2001) (Semenza y col., 1996) (Semenza y col., 1994) (Semenza y col., 1994) (Semenza y col., 1994) (Minchenko y col., 2002)
Proliferación celular y supervivencia	Factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2) TGF- $\alpha$ Adrenomedulina (ADM) Inhibina beta A/Activina A (INHBA)	(Feldser y col., 1999)  (Krishnamachary y col., 2003) (Cormier-Regard y col., 1998)
Apoptosis	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3 (BNIP/NIP-3) Proteína X similar a Nip3 (NIX)	(Carrero y col., 2000) (Bruick, 2000)
Adhesión y trans migración leucocitaria	Receptor 4 de quimioquinas con motivos CXC (CXCR4)	

**Tabla 3. Principales genes modificados por HIF-1 $\alpha$  en respuesta a hipoxia y procesos celulares en los que están implicados.** Datos extraídos de Ke y Costa, 2006 y de Manalo y col., 2005.

## OBJETIVOS

## **II. OBJETIVOS**

### **Objetivos**

**Objetivo 1** - Caracterización de la secuencia promotora del gen *ACVRL1* humano, y estudio de los mecanismos basales que regulan su transcripción.

**Objetivo 2** - Estudio de la regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al daño endotelial.

**Objetivo 3** - Estudio de la regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al estímulo hipóxico en el endotelio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

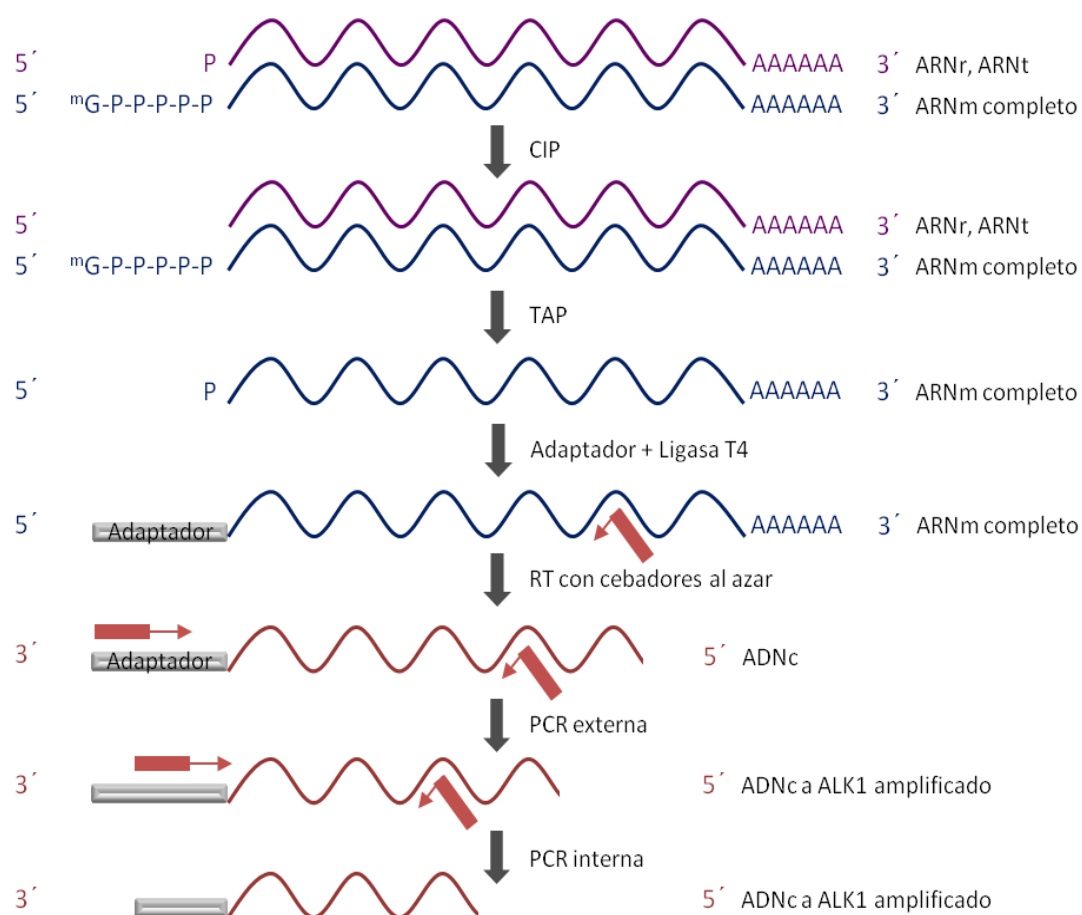
#### 1 Análisis por amplificación de extremos 5' de ADN complementario (5' RACE)

Para hallar los sitios de inicio de transcripción se utilizó un protocolo mejorado de 5'-RACE con ligación modificada (RLM-RACE, Ambion Inc., Austin, TX). El ARN total procedente del cultivo primario de células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano (HUVEC) se extrajo y purificó con el sistema de extracción *RNeasy* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones comerciales. El protocolo de RLM-RACE consiste en el pretratamiento del ARN total para eliminar moléculas de ARN mensajero incompletas, así como la presencia de ARN de transferencia y ribosómico, mediante reacciones enzimáticas que seleccionan el ARN mensajero (ARNm) de buena calidad. Para ello, el ARN total se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP) que elimina el fosfato en el extremo 5' de todas las especies de ARN excepto del ARNm con buen grado de conservación, que mantiene su estructura capsular en el extremo 5'. A continuación, la muestra se trató con pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP), que elimina la estructura capsular dejando un fosfato en 5' disponible para la ligación.

Materiales y  
métodos

Partiendo de esa población preseleccionada, un oligonucleótido sintético de ARN se ligó al extremo 5' de dichos ARNm y éstos ARNm quiméricos fueron transcritos de modo reverso con transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV RT, Roche *Diagnostics*, Mannheim, Alemania). El ADNc (complementario al ARNm) resultante se utilizó para las dos PCR anidadas, utilizando como cebadores en 5' dos oligonucleótidos que reconocen la secuencia del adaptador sintético en 5', uno externo y otro interno; y como cebadores reversos en 3' dos oligonucleótidos específicos del ARNm de ALK1, complementarios a una región exónica, uno externo y otro interno. La reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevó a cabo a una temperatura de anillamiento de 58°C, usando una *Taq* polimerasa *Hot Master* (Eppendorf, Westbury, NY). Un esquema explicativo de la técnica se muestra en la Figura 14. Las secuencias de todos los cebadores se encuentran en la Tabla 4.

Los productos de PCR anidada se analizaron en geles de agarosa/TAE y se detectaron con el agente intercalante de ADN Bromuro de Etidio. Tras la visualización en un sistema de transiluminación *GelDoc* (BioRad, Hercules, CA), se recortaron las bandas, se purificaron en columnas de extracción de ADN (*DNA Gel extraction kit*, Millipore, Billerica, MA) y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO-TA (Invitrogen, Eugene, OR). Tras el clonaje, los ADNc obtenidos fueron secuenciados en un sistema de secuenciación automática capilar por la empresa Secugen S.L.



Materiales y métodos

**Figura 14. Esquema de la técnica de amplificación de extremos 5' de ADN complementario (5'RACE).** De la mezcla de ARNs de distinta naturaleza presentes en la célula (ARNr, ribosómico; ARNt, de transferencia; ARNm, mensajero, tanto completo como moléculas incompletas) se seleccionan las moléculas de ARNm completo mediante el tratamiento con dos enzimas. Primero, la fosfatasa intestinal de ternera (CIP), elimina el fosfato en el extremo 5' de todas las especies de ARN excepto del ARNm con alto grado de conservación que posea su estructura capsular en el extremo 5' (la cual impide la defosforilación). Después, el tratamiento con pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP), hidroliza el enlace de la cadena pirofosfato dejando un solo fosfato en el extremo 5' de la cadena de ARNm. Una vez seleccionada esa población de moléculas, se liga con un adaptador consistente en un oligorribonucleótido al extremo 5' gracias a la presencia del fosfato, utilizando la ligasa del fago T4. A partir de la población de ARNm unidos al adaptador en 5' se transforma en una población de ADNc complementarios (ADNc) por retrotranscripción (RT) usando cebadores al azar, que conservan dicho adaptador. La realización de dos PCR anidadas usando cebadores complementarios al adaptador (uno externo y posteriormente uno interno) y un cebador complementario a un segmento conocido del ARNm de ALK1 en el extremo opuesto dará como resultado la amplificación y enriquecimiento de todos los tipos de ARNm de ALK1 presentes en la muestra.

USO	NOMBRE	SECUENCIA
5'-RACE	Adaptador en 5'	5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCU GGCUUUGAUGAAA-3'
	Cebador externo adap. Fw	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'
	Cebador externo ALK1. Re	5'-GGGAGAGTCCAGTCTCATCTGAA-3'
	Cebador interno adapt. Fw	5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'
	Cebador interno ALK1. Re	5'-GCAGTAGTGGTTGACGAACCTCGGT-3'

**Tabla 4. Secuencias nucleotídicas del adaptador y de los cebadores utilizados en el 5'RACE.** Las abreviaturas empleadas son: Fw, cebador en sentido 5'-3' (del inglés *forward*); Re, cebador en sentido 3'-5', complementario reverso (del inglés *reverse*). El adaptador está compuesto de ribonucleótidos (ARN) mientras que los cebadores están formados por desoxinucleótidos (ADN).



## 2 Clonaje de la región 5' del promotor proximal del gen ACVRL1

El fragmento genómico situado entre las posiciones -1.035 y +210 de la región 5' del promotor proximal del gen *ACVRL1* (pALK1) fue amplificado por PCR y clonado en el vector pCR2.1-TOPO-TA (Invitrogen). Este vector aprovecha las adeninas en los extremos 5' de cada hebra del fragmento de PCR (dejadas ahí por la *Taq* polimerasa) y las liga con las timinas, que posee el propio vector abierto en ambas hebras, gracias a la presencia de topoisomerasas. Además, comparte las dianas *SacI/XhoI* con el vector pGL2-basic (Promega, Madison, WI).

La digestión de la construcción del pALK1 en pR2.1-TOPO con *SacI/XhoI* liberó el inserto que, tras purificación, fue introducido en las mismas dianas del vector definitivo pGL2-basic, mediante ligación con la ligasa del fago T4 (Roche *Diagnostics*), en presencia de ATP (Adenosin-trifosfato) 10 mM. Dicho vector pGL2-basic es un vector reportero de actividad transcripcional, al poseer el gen de la luciferasa de luciérnaga, carente de promotor, inmediatamente después del sitio de clonaje.

El fragmento de promotor clonado está situado entre las posiciones 50.586.434 y 50.587.679 del brazo largo del cromosoma 12 (según las numeraciones del fragmento genómico identificado como NC\_000012.10 del *GenBank*). La construcción se secuenció con los cebadores comerciales GL1 y GL2 (Promega) y se comprobó su correspondencia con la secuencia genómica disponible en el *GenBank* (Gene ID: 94).

### 2.1 Generación de varias construcciones mediante delecciones seriadas en el extremo 5' del promotor del gen ACVRL1

Se generaron cuatro fragmentos mediante sucesivas delecciones del extremo 5' de la secuencia sometida a estudio. Para ello, se amplificó el ADN genómico molde por PCR, usando cebadores diseñados cada 150 pares de bases aproximadamente, en la hebra 5'-3', acortando cada vez más por el lado 5'. Las secuencias de dichos cebadores están detalladas en la Tabla 5 y corresponden con las posiciones -898/-880; -587/-569; -422/-404 y -284/-263. En todos los casos el cebador reverso complementario a la hebra 3'-5' fue el mismo, y correspondió a la posición +42/+59. Los fragmentos resultantes comprenden las regiones siguientes: pALK1 -898/+59 (957 pb); pALK1 -587/+59 (646 pb); pALK1 -422/+59 (481 pb) y pALK1 -284/+59 (343 pb). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa/TAE-bromuro de etidio, recortados y purificados en columnas de extracción de ADN (Millipore). Tras ello, fueron introducidos en el vector de clonaje pCR2.1-TOPO-TA (Invitrogen), escindidos por los sitios

*SacI/XhoI* e introducidos en pGL2-basic (Promega). Se comprobó el resultado secuenciando con los cebadores GL1 y GL2.

USO	NOMBRE	SECUENCIA
Cebadores PCR Clonaje	-898/-880 Fw	5'-GAAGCCATTCTGCTTCCC-3'
	-587/-569 Fw	5'-ACAAATGGGGGACGAAGG-3'
	-422/-404 Fw	5'-AAGGATAGGTAGTGTCCC-3'
	-281/-263 Fw	5'-ACGTTGCCTACAGTCTCG-3'
	+42/+59 Re	5'-ATTCCAGCGTCTTCCTGC-3'

**Tabla 5. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para el clonaje.** Las abreviaturas empleadas son: Fw, cebador en sentido 5'-3' (del inglés *forward*); Re, cebador en sentido 3'-5', complementario reverso (del inglés *reverse*).

### 3 Análisis *in silico* del promotor de ACVRL1 y alineamiento con otras especies

Para el análisis teórico de la secuencia (*in silico*) del promotor del gen *ACVRL1* e identificación de los sitios de reconocimiento putativo por factores de transcripción, se utilizó la herramienta *MatInspector* de Genomatix ([www.genomatix.de/products/MatInspector/](http://www.genomatix.de/products/MatInspector/)) (Cartharius y col., 2005), que compara los sitios hallados con matrices generadas con distintos sitios funcionales en grupos de genes regulados por los mismos factores de transcripción, y optimiza los umbrales de similitud para eliminar falsos positivos.

El fragmento promotor de *ACVRL1* sometido a estudio fue comparado con promotores de genes ortólogos en varias especies de mamíferos. Las secuencias a alinear fueron elegidas buscando el inicio de transcripción en todas ellas, y eligiendo el mismo fragmento que en humano, entre las posiciones -1.035 y +210. Los números de acceso a las secuencias génicas, así como los fragmentos alineados de cada especie, son: *Mus musculus* (GenBank: NT\_039621; 62.243.937 – 62.245.182 pb; Hebra 5'-3'), *Rattus norvegicus* (GenBank: NW\_047784; 6.594.766 – 6.596.011 pb; Hebra 5'-3'), *Bos taurus* (GenBank: NW\_001495018; 123.378 – 122.133 pb; Hebra 3'-5'), *Canis familiaris* (GenBank: NW\_76284; 3.087.613 – 3.086.368 pb; Hebra 3'-5'), *Pan troglodytes* (GenBank: NC\_006479; 2.296.228 – 2.294.983 pb; Hebra 3'-5'), *Pongo pygmaeus* (EMBL: 413.52; 51.613.841 – 51.615.086 pb; Hebra 5'-3'), *Equus caballus* (GenBank: NW-001799728.1; 49.678.- 50.923; Hebra 5'-3') y *Macaca mulatta* (GenBank: NW\_001096621; 1.104.215 – 1.105.460 bp; Hebra 5'-3'). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con la herramienta informática ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) (Larkin y col., 2007), que genera valores de similitud entre cada especie y la humana, comprendidos entre una escala 0 - 100. Para la representación

gráfica de los sitios consenso para factores de transcripción se utilizó la herramienta *WebLogo* (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks y col., 2004).

## 4 Cultivos celulares

---

La línea celular embrionaria Schneider S2 procedente de *Drosophila melanogaster*, que crece en suspensión, se cultivó en medio de cultivo DES (*Drosophila-Enriched-Schneider insect medium*, Sigma Aldrich, St Louis, MO) con 0,1 µg/µl de gentamicina (Gibco, Paisley, Reino Unido).

Las líneas celulares inmortalizadas humanas HEK293T (procedente de epitelio renal embrionario humano), Phoenix (empaquetadora de partículas retrovirales, Orbigen Inc, San Diego, CA), y HeLa (epitelial de tumor cervical humano) se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco).

Materiales y  
 métodos

Para el cultivo de las líneas celulares inmortalizadas endoteliales HMEC-1 (*Human Microvascular Endothelial Cell line-1*) (Ades y col., 1992), y GM7372 (endoteliales fetales aórticas de origen bovino) se necesita un sustrato que ejerza las funciones de matriz extracelular. Para ello, las placas fueron tratadas con una capa de gelatina bovina (Sigma Aldrich) al 0,2% en PBS durante una hora a 37°C, previo al cultivo en medio MCDB-131 (Gibco), suplementado con 1 ng/mL de EGF (*Epidermal growth factor*) y 1 µg/mL de hidrocortisona.

Los cultivos primarios de células endoteliales derivadas de vena umbilical humana (HUVECs. Obtenidas de Lonza) y de células endoteliales derivadas de sangre periférica humana (BOEC) (Fernandez y col., 2005) fueron cultivados en placas tratadas con gelatina bovina, con medio EBM2 (*Endothelial Basic Medium*, Lonza, Walkersville, MD) suplementado con EGM2 *Singlequots* (*Endothelial Growth Medium*, Lonza).

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con un 10% de SBF (suero bovino fetal, Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco).

### 4.1 Tratamiento con citoquinas: TGF-β1 y BMP9

---

Las proteínas recombinantes humanas TGF-β1 y BMP9 fueron adquiridas de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se usaron a las concentraciones y tiempos indicados en cada experimento, en medio de cultivo apropiado para cada tipo celular, en presencia de una

concentración de 0,2% de SBF, para evitar el enmascaramiento de los resultados por la presencia de factores de crecimiento circulantes en el suero.

#### 4.2 Tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina

---

Las células HUVEC, HMEC-1 y HEK293T fueron tratadas con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina (en lo sucesivo, 5-aza-dC, Sigma Aldrich) a concentraciones finales 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, atendiendo a publicaciones anteriores (Butta y col., 2006). En el caso de las células HUVEC, sólo se empleó la concentración 1  $\mu$ M al resultar tóxica la de 5  $\mu$ M. El tratamiento se llevó a cabo durante una semana, cambiando el medio cada dos días desde el inicio. Después, las células se lisaron y se extrajo su ARN con el sistema comercial *RNeasy* (Qiagen). Los niveles de ARN mensajero de ALK1 e Id1 se midieron por PCR en tiempo real según metodología explicada en el apartado correspondiente y cebadores mostrados en la Tabla 8.

Materiales y  
métodos

#### 4.3 Modelo de daño endotelial *in vitro* o *wound healing*

---

Para los experimentos de daño endotelial o *wound healing*, las células endoteliales HMEC-1 o HUVEC fueron sembradas hasta confluencia en placas de 100 mm de diámetro. Después se realizó una herida con una punta de pipeta a lo largo de la placa y se observó la proliferación y migración de las células para cerrar la herida a distintos tiempos. En el caso de los experimentos previos a inmunoprecipitación de cromatina, se hicieron múltiples heridas a lo largo de toda la placa, con el objetivo de dañar el mayor número posible de células endoteliales, cambiando el medio inmediatamente.

#### 4.4 Tratamiento con desferrioxamina y cultivo de las células en cámara de hipoxia

---

Las células fueron sometidas a 100  $\mu$ M de desferrioxamina (DFO) durante los tiempos establecidos en cada experimento y que se indican en cada caso. Posteriormente, los efectos obtenidos en la simulación con DFO se contrastaron con efectos de hipoxia real. Para ello las células fueron cultivadas en una cámara de hipoxia (Billups-Rothemberg, Inc, Del Mar, CA) con atmósfera compuesta por un 1% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 94% de N<sub>2</sub>, durante los tiempos indicados en cada caso. En paralelo se cultivaron células control en condiciones de normoxia (20% de O<sub>2</sub>).

## 5 Vectores de expresión y metodología de la transfección

Las transfecciones de las líneas celulares se llevaron a cabo utilizando el reactivo de transfección Superfect (Qiagen), siguiendo las instrucciones comerciales. Las células adherentes HEK293T, HMEC-1, y Phoenix se plaquearon a  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo de 35 mm el día anterior a la transfección. Las células en suspensión Schneider S2 se plaquearon a  $5 \times 10^4$  células/pocillo de 35 mm el mismo día de la transfección. Los plásmidos se incubaron en medio Optimem (Gibco) sin SBF ni antibióticos junto con el Superfect, durante 15 minutos y posteriormente se plaquearon sobre las células, dejándolas en el incubador a 37°C. A las tres horas de la transfección, los cultivos se lavaron con PBS y se cambió el medio por medio fresco completo (20% SBF). Las células se recogieron y lisaron tras 48 horas y se midió su actividad luciferasa o la expresión de una proteína concreta por inmunodetección según el caso.

Materiales y  
métodos

Para los experimentos de sobreexpresión de Sp1 o KLF6, se realizó la cotransfección del vector reportero de actividad de pALK1 con plásmidos de sobreexpresión de Sp1 y KLF6 que fueron, en el caso de las Schneider S2, pAc-Sp1 y pAc-KLF6 (con expresión dependiente del promotor de actina de *Drosophila*), y, en el caso de las HEK293T, pCIneo-Sp1 y pCIneo-KLF6 (con expresión dependiente del promotor de citomegalovirus), normalmente utilizado en células de mamífero. En ambos casos se completaron las dosis de ADN total transfectado utilizando los respectivos vectores vacíos. Al ser las S2 más difíciles de transfectar, la cantidad de ADN utilizado para la transfección fue superior (1 µg de reportero por pocillo y 500 ng para el resto de tipos celulares). El resto de plásmidos utilizados para transfectar se muestran en la Tabla 6.

La actividad transcripcional del pALK1 o de los reporteros p(BRE)<sub>2</sub>-luc, HRE-luc (revelada por la actividad luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*) se normalizó cotransfectando bien un vector de expresión de β-galactosidasa o un vector con actividad luciferasa de *Renilla reniformis*, ambos vectores acoplados a promotores fuertes. De este modo se normaliza el resultado según la eficiencia del proceso de transfección (es decir, del número de células transfectadas). Tras 48 horas de transfección, las células se recogieron y las actividades enzimáticas de luciferasa/β-galactosidasa o luciferasa/*Renilla* se detectaron con los sustratos provistos por el sistema *Dual Luciferase Assay System* (Promega) y se analizaron en un luminómetro TD-20/20 (Promega) para tubos o en los luminómetros *Dynex* (*Dynex technologies*, Chantilly, VA) y *Varioskan* (*Thermo Scientific*, Erembodegem, Bélgica) para placas.

En algunos casos, los resultados se normalizaron representando las actividades respecto a la actividad basal, a la que se otorgó arbitrariamente el valor 1 o 100%, según el caso.

	NOMBRE	ORIGEN	TIPO
	pGL2-basic- <i>luc</i>	Promega	Reportero de luciferasa
	pGL2-(-1035/+210)pALK1	Inserción en <i>SacI/XhoI</i> en pGL2 basic (Garrido-Martin y col., 2010)	
	pGL2-(-898/+59)pALK1		
	pGL2-(-587/+59)pALK1		
	pGL2-(-422/+59)pALK1		
	pGL2-(-284/+59)pALK1		
	pCIneo- $\phi$	Promega	Vector de expresión dirigida por el promotor fuerte de citomegalovirus (para expresión en células de mamífero)
	pCIneo-Sp1	(Ratziu y col., 1998)	
	pCIneo-KLF6	(Ratziu y col., 1998)	
	pAc- $\phi$		Vector de expresión dirigida por el promotor fuerte del gen de actina 5C de <i>Drosophila</i>
	pAc-Sp1	Robert Tjian, Univ. California, Berkeley (Courey y Tjian, 1988; Gill y col., 1994)	
	pAc-KLF6	(Ratziu y col., 1998)	
	pRL-TK	Promega	Vector reportero de luciferasa de <i>Renilla reniformis</i> acoplado al promotor constitutivo de timidina quinasa del virus <i>Herpes simplex</i> . Se usa para medir eficiencia de transfección
	pCMV-Sport- $\beta$ Gal	Invitrogen	Vector reportero de actividad $\beta$ -galactosidasa acoplado a promotor constitutivo de citomegalovirus. Se usa para medir eficiencia de transfección
	pcDNA3.1(+)- $\phi$	Invitrogen	Vector de expresión dirigida por el promotor fuerte de citomegalovirus
	pcDNA3-HA-HIF-1 $\alpha$	Dra. Edurne Berra CIC-bioGUNE (Richard y col., 1999)	Contiene la forma dominante negativa de HIF-1 $\alpha$
	pcDNA3-HA-HIF-1 $\alpha$ DN	Dra. Edurne Berra CIC-bioGUNE (Richard y col., 2000)	
	pcDNA3-HIF-2 $\alpha$	Dr. Luis del Peso UAM-IIB Alberto Sols	
	pcDNA3-HA-HIF-1 $\beta$	Dr. L.E. Huang Harvard, Boston	
	pXp2-TATA	Dr. Ángel Corbí CIB-CSIC, Madrid (Sanchez-Elsner y col., 2001)	Promotor mínimo de prolactina de rata inserto en el vector carente de promotor pXp2 (-36 a +37)
	pGL2-pID1	(Tournay y Benezra, 1996)	Fragmento -1585/+88 del promotor de <i>ID1</i>
	P(BRE) <sub>2</sub> -luc	(Korchynskyi y ten Dijke, 2002)	Contiene 2X [(-1052/-1032)/(-1105/-1080)] en tándem del promotor de <i>ID1</i>
	9XHRE-luc	Manuel Órtiz de Landázuri UAM	Contiene nueve repeticiones en tándem del elemento de respuesta a hipoxia (HRE) del promotor de VEGF situado en las posiciones -985/-951
	pSuperRetro-shARN- $\phi$	OligoEngine, Seattle, WA	Vector de expresión retroviral conteniendo una secuencia de shARN irrelevante
pSuperRetro-shARN-KLF6	(Brummelkamp y col., 2002; Li y col., 2005)	Vector de expresión retroviral conteniendo una secuencia de shARN específica de KLF6	
pLSLG-shARN-luc	Dr. Stefano Indraccolo Inst. oncolog. Veneto. Padua. Italia	Vector de expresión retroviral conteniendo una secuencia de shARN específica de luciferasa	
pLSLG-shARN-HIF-1 $\alpha$	(Indraccolo y col., 2002)	Vector de expresión retroviral conteniendo una secuencia de shARN específica de HIF-1 $\alpha$	

Materiales y métodos

**Tabla 6. Plásmidos utilizados en esta Tesis.** Abreviaturas utilizadas:  $\Phi$ , vector vacío; BRE, elemento de respuesta a BMP; DN, dominante negativo; HRE, elemento de respuesta a hipoxia.

## 6 Ensayos de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia pequeño

### 6.1 Transfección de siARN-Sp1 en HEK293T

El ARN pequeño de interferencia de la expresión de Sp1 humano (siARN, *small interfering* ARN) fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (sc-29487, Santa Cruz, CA). Las células HEK293T fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Tras 24 horas, las células se transfectaron con 5 pmoles de siRNA-Sp1 o un siARN irrelevante (siARN-Sc, del inglés *scrambled*, al azar), usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Tras 24 horas, se transfectaron 500 ng de pGL2-pALK1 y 25 ng de pRL-TK usando Superfect (Qiagen). La actividad luciferasa/*Renilla* se midió a las 24 horas y se representó con respecto a la actividad basal (100%). En paralelo, a las 48 horas post-transfección se lisaron alícuotas para extraer ARN y proteína y se analizaron los niveles de ARNm y de proteína de Sp1 mediante PCR semicuantitativa e inmunodetección de proteínas, respectivamente. Los cebadores se indican en la Tabla 8 y los anticuerpos empleados en la Tabla 7.

Materiales y  
métodos

### 6.2 Transfección de siARN-HIF-1 $\alpha$ en HMEC-1

En este caso, se utilizaron tres siARN distintos para HIF-1 $\alpha$ , para asegurar la efectividad. Todos ellos fueron adquiridos de Ambion Inc. Los números de identificación de los tres siARNs utilizados son: 144736, 106499 y 3187 (Ref. AM16708A). Como control negativo se usó siARN-neg-FAM (Ref. AM4620) y como control positivo siARN-GAPDH-FAM (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, acoplado a 6-carboxi-fluoresceína, Ref. AM4650), ambos de Ambion, pudiendo monitorizar el proceso de transfección mediante visualización por microscopía de fluorescencia. Al ser las células HMEC-1 más difíciles de transfectar que las HEK293T, se optimizó el proceso de transfección de siARNs utilizando el reactivo de transfección RNAiMax (Invitrogen).

### 6.3 Infección de HUVECs con partículas retrovirales productoras de shARN-KLF6 ó shARN-HIF-1 $\alpha$

Las células HEK293T se transfectaron con los vectores pSuperRetro-ctrl (vector control con shARN irrelevante) o pSuperRetro-KLF6 (codificando shARN-KLF6) (Brummelkamp y col., 2002; Li y col., 2005) usando Superfect. Este plásmido posee los tres genes estructurales del retrovirus (*gag*, *pol* y *env*), de tal modo que permite su encapsidación, y además porta la información para la producción de horquillas de ARN (*small hairpin* ARNs, shARN), que son

reconocidos por la enzima Dicer en el citoplasma celular y procesados hasta dar los siARNs lineales (Brummelkamp y col., 2002).

Los sobrenadantes retrovirales se recogieron tras 24, 48 y 72 horas, se filtraron con un filtro de 0,45  $\mu$ M de diámetro, y se incubaron toda la noche con polietilenglicol 8000 (PEG8000) a una concentración 10% p/v en DMEM. Posteriormente, se concentraron centrifugando 15 minutos a 4.000 rpm. El sedimento se resuspendió en medio EBM2-EGM2 con 8  $\mu$ g/mL de polibreno (Sigma Aldrich). El cultivo primario de HUVECs se puso en contacto con las suspensiones de partículas retrovirales durante 6 horas a 37°C y después la infección se potenció mediante centrifugación durante 30 min a temperatura ambiente. Previo cambio de medio, las células se reintrodujeron en el incubador durante otras 24 horas para recuperar la viabilidad del cultivo y conseguir el silenciamiento de la proteína, y posteriormente se seleccionaron con 2  $\mu$ g/mL de puromicina durante otras 48 horas.

Materiales y  
métodos

Para los ensayos de silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ , las células empleadas fueron las células Phoenix, empaquetadoras de retrovirus derivadas de HEK293T, que poseen los genes *gag-env-pol*, ya que los plásmidos empleados en este caso (pLSLG-shARN-Luc y pLSLG-shARN-HIF-1 $\alpha$ ) no los codifican. Ambos plásmidos fueron amablemente cedidos por el Dr. Stefano Indraccolo, Instituto Oncológico Veneto, IRCCS, Padua, Italia (Indraccolo y col., 2002).

## 7 Ensayos de metilación *in vitro* sobre promotor

Los plásmidos conteniendo los promotores de interés fueron tratados *in vitro* con la metilasa M.SssI (New England Biolabs, Ipswich, MA), específica de islas CpG, en ausencia o presencia del sustrato S-adenosil metionina (SAM) a concentración 160  $\mu$ M. La eficacia de metilación tras el tratamiento se comprobó mediante la digestión diferencial con las enzimas de restricción *HpaII* y *MspI* (New England Biolabs). Ambas enzimas reconocen la diana 5'-C|CGG-3' pero la enzima *HpaII* no reconoce la diana cuando está metilada, mientras que la enzima *MspI* es insensible al estado de metilación y sigue siendo activa, digiriendo la diana. Por tanto el patrón de restricción de ambas enzimas es diferente dependiendo del estado de metilación de las islas CpG. Las células HEK293T se transfectaron con 100 ng del promotor correspondiente, en experimentos en paralelo con promotor metilado y sin metilar (sin SAM), 100 ng del vector de expresión pCIneo-Sp1 y cantidades pequeñas del vector de normalización pRL-TK. La actividad de los promotores se midió a las 48 horas por medio de su actividad luciferasa normalizando a la actividad *Renilla*. El mismo procedimiento se utilizó también para



metilar las sondas de ADN de doble cadena en los ensayos de movilidad electroforética retardada.

## 8 Citometría de Flujo

Las células a analizar se despegaron de las placas de cultivo con tripsina-EDTA, se centrifugaron y se resuspendieron en un volumen mínimo de PBS. Después, se bloquearon con suero AB<sup>+</sup> humano (2% en PBS) durante media hora a 4°C previamente a la incubación con el anticuerpo primario (una hora a 4°C). Los anticuerpos se detallan en la Tabla 8. Como anticuerpos secundarios se emplearon mezclas de IgG policlonales acoplados al fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen): IgGs de cabra anti-IgGs de conejo e IgGs de conejo anti-IgGs de ratón, según el caso. Se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se analizaron en un citómetro EPICS XL (Coulter, Hialeah, FL) y se representó la intensidad de fluorescencia en cada situación respecto a la intensidad de fluorescencia en la situación basal a la que se asignó arbitrariamente el valor 1. Se contaron, al menos, 10.000 células para cada punto experimental.

Materiales y  
métodos

	PROTEÍNA QUE RECONOCE	ISOTIPO DE ANTICUERPO	ESPECIE DONDE SE GENERÓ	ESPECIE QUE RECONOCE	APLICACIÓN	REFERENCIA
ANTICUERPOS	β-Actina	mAb IgG <sub>1</sub>	Ratón	Humano	WB	Sigma Aldrich A1978 clon AC-15
	ALK1	poAb	Conejo	Humano	CF	(Abdalla y col., 2000)
	ALK1	mAb IgG <sub>2</sub>	Rata	Ratón	IHC	CellSciences* CMA106
	ALK1	mAb IgG <sub>2A</sub>	Ratón	Humano	CF	R&D Systems MAB170
	CXCR4	IgG <sub>2</sub>	Ratón	Humano	CF	--
	Endoglina	mAb IgG <sub>1</sub>	Ratón	Humano	CF	(Pichuantes y col., 1997) Clon P4A4
	HIF-1α	mAb	Ratón	Humano	WB	Eduerne Berra
	HIF-1α	mAb	Ratón	Humano	EMSA	LabVision* MS-702-P1AB-X Clon OZ15
	HIF-1α	mAb	Ratón	Humano	EMSA	LabVision* MS-701-P1AB-X Clon OZ12
	HIF-1α	poAb	Conejo	Humano	EMSA	Santa Cruz Biotech. sc-10790 Clon H-206

	HIF-1 $\beta$	mAb	Ratón	Humano	EMSA	LabVision* MS-1165- P1AB-X Clon H1- $\beta$ 234
	Histona 3	poAb	Conejo	Humano	ChIP	Abcam* ab8580
	HLA-I	mAb IgG <sub>2A</sub>	Ratón	Humano	CF	Clon W6/32 (elaborado en el laboratorio)
	KLF6	poAb	Conejo	Humano, ratón	CF, ChIP	Santa Cruz Biotech. sc-7158
	NF $\kappa$ B	poAb	Conejo	Humano	EMSA	Santa Cruz Biotech. sc-7178X clon H119
	PECAM (CD31)- FITC	mAb	Hámster	Ratón	IF	---
	PECAM (CD31)	mAb	Ratón	Humano	CF	Propio
	P-Smad1 (Ser 463/Ser 465)	poAb	Conejo	Humano	WB	Cell Signaling
	Smad4	mAb	Ratón	Humano	EMSA	Santa Cruz Biotech. sc-7966X clon B-8
	Sp1	poAb	Conejo	Humano	EMSA, ChIP, WB	Santa Cruz Biotech. sc-59 y sc-59X clon PEP2
	Sp3	poAb	Conejo	Humano	EMSA	Santa Cruz Biotech. sc-644X

Materiales y  
métodos

**Tabla 7. Anticuerpos utilizados en esta Tesis.** Las abreviaturas hacen referencia a: CF, Citometría de flujo; ChIP, inmunoprecipitación de cromatina; EMSA, ensayo de movilidad electroforética retardada; FITC, Isotiocianato de fluoresceína; IF, inmunofluorescencia; IgG, inmunoglobulinas-G; IHC, inmunohistoquímica; mAb, anticuerpo monoclonal; poAb, anticuerpo policlonal; WB, *western blot*. (\*Notas: Cell Sciences, Canton, MA; LabVision, Fremont, CA; Abcam, Cambridge, MA).

## 9 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real time* RT-PCR)

Para el análisis cuantitativo de la cantidad de transcritos de ALK1, el ARN total de las células fue aislado y purificado usando los reactivos del sistema comercial *RNeasy* (Qiagen). Este ARN fue retrotranscrito con la AMV-RT de Roche, y el ADNc resultante fue utilizado como molde de la reacción de PCR en tiempo real. Para ello, se utilizó la mezcla de reacción *iQ SyBR Green Supermix* (BioRad), que contiene la polimerasa, el Mg<sub>2</sub>Cl a concentración necesaria, la mezcla de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), y el tampón de reacción. Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 8. Como control interno, se amplificó el gen 18S ribosomal humano, debido a su abundante expresión, que no se altera por los mecanismos normales de regulación transcripcional. En el caso de las

muestras de procedencia murina, el gen de referencia utilizado para normalizar fue el de GAPDH. Se realizaron triplicados de cada muestra y de cada experimento, mostrándose la media de los experimentos.

USO	NOMBRE	SECUENCIA
Cebadores qRT-PCR	hALK1 Fw	5'-ATCTGAGCAGGGCGACAGC-3'
	hALK1 Re	5'-ACTCCCTGTGGTGCAGTCA-3'
	mALK1 Fw	5'-TGACCTCAAGAGTCGCAATG-3'
	mALK1 Re	5'-CTCGGGTGCCATGTATCTTT-3'
	hBNIP/NIP3 Fw	5'-GCACTTCAGCAATGGGAATGG-3'
	hBNIP/NIP3 Re	5'-GAGCTCTTGAGCTGCTTCGT-3'
	hENG Fw	5'-GCCCCGAGAGGTGCTTCT-3'
	hENG Re	5'-TGCAGGAAGACACTGCTGTTTAC-3'
	mENG Fw	5'-CTTCCAAGGACAGCCAAGAG-3'
	mENG Re	5'-TTCTGGCAAGCACAAGAATG-3'
	hGAPDH Fw	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	hGAPDH Re	5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'
	mGAPDH Fw	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'
	mGAPDH Re	5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATG-3'
	hHIF-1 $\alpha$ Fw	5'-TGATGACCAGCAACTTGAGG-3'
	hHIF-1 $\alpha$ Re	5'-TTGATTGAGTGCAGGGTCAG-3'
	hId1 Fw	5'-GCTGCTCTACGACATGAACG-3'
	hId1 Re	5'-CTCCAAGTGAAGTCCCTGA-3'
	hKLF6 Fw	5'-CGGACGCACACAGGAGAAAA-3'
	hKLF6 Re	5'-CGGTGTGCTTTCCGGAAGTG-3'
	mKLF6 Fw	5'-GAGGCTGGCAGCGGAGCTTTG-3'
	mKLF6 Re	5'-GTCGGGTGGAAAAGACAGTCC-3'
	hSp1 Fw	5'-TGCAGCAGAATTGAGTCACC-3'
	hSp1 Re	5'-TTGGTACTGCTGCCACTCTG-3'
	h18S Fw	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'
	h18S Re	5'-CGCTCCACCACTAAGAACG-3'

Materiales y métodos

**Tabla 8. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR cuantitativa (qRT-PCR).** Las abreviaturas empleadas son: Fw, cebador en sentido 5'-3' (del inglés *forward*); Re, cebador en sentido 3'-5', complementario reverso (del inglés *reverse*). Los nombres de los oligonucleótidos señalados con una "h" reconocen las secuencias humanas y los marcados con "m" las secuencias murinas.

## 10 Electroforesis e inmunodetección de proteínas (*western blot*)

Las células se lisaron durante 30 minutos a 4°C en agitación orbital con tampón de lisis celular, que varió su composición según la localización celular de la proteína de interés. En el caso de las proteínas nucleares, se utilizó un tampón de lisis comercial (*Nuclear Extract Kit*, Active Motif). En el caso de las proteínas de membrana, la composición del tampón fue: NaCl 150 mM, glicerol 10%, Hepes (pH 7,4) 50 mM, EGTA 100  $\mu$ M, EDTA 500  $\mu$ M, NaF 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, digitonina 1% y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics). Para la detección de proteínas fosforiladas, se empleó una composición

especial, añadiendo  $\beta$ -glicerolfosfato 40 mM e inhibidores de fosfatasa (imidazol 200 mM, NaF 100 mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  115 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  100 mM y tartrato sódico  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  400 mM). A continuación, las placas fueron raspadas y los extractos celulares se centrifugaron durante 5 minutos a 13.400 r.p.m. a 4°C para eliminar los restos de membranas celulares. La concentración de proteína en los sobrenadantes de lisis se determinó por la reacción de Bradford (BioRad), respecto a una recta patrón de calibrado de albúmina sérica bovina (BSA, Roche Diagnostics). Las proteínas se separaron y analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS). Los lisados celulares se complementaron con tampón de carga Laemmli y se desnaturalizaron en bloque térmico a 95°C durante 5 minutos antes de su carga en el gel. Para las condiciones reductoras, además, se añadió como agente reductor el ditioneitol (DTT) a concentración final 100 mM (Sigma Aldrich). El sistema electroforético empleado fue el MiniProtean III (BioRad). Las proteínas se separaron en función de sus pesos moleculares y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) o nitrocelulosa (Millipore), según el caso. Para evitar reconocimientos inespecíficos en la interacción con el anticuerpo, las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05%). Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C, según el caso, en agitación suave. Tras tres lavados de 10 minutos en agitación enérgica con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (Dako Diagnostics, Glostrup, Dinamarca) acoplado a HRP (peroxidasa) durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave y se repitieron los lavados. Las bandas reconocidas por los anticuerpos se detectaron añadiendo el sustrato de la peroxidasa y provocando una reacción de quimioluminiscencia. Para ello se empleó el sistema comercial SuperSignal (Pierce, Rockford, IL), poniendo en contacto la membrana con la película fotográfica Curix RP2 Plus (AGFA) que se procesó en un revelador AGFA-Curix. El densitometrado de las bandas se llevó a cabo mediante el programa Adobe Photoshop CS.

## **11 Marcaje de proteínas celulares por técnicas de inmunofluorescencia**

---

Las células se sembraron sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro previamente tapizados con gelatina bovina (Sigma Aldrich) al 0,2% en PBS, colocados en placas de 24 pocillos. Tras 24 horas, las muestras se fijaron con formaldehído al 3,5% en PBS durante

20 minutos a 4°C. En los casos de marcaje de proteínas citosólicas o nucleares, a la mezcla de fijación se añadió como agente permeabilizante L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (Sigma Aldrich) a una concentración 100  $\mu$ g/mL. El bloqueo posterior se realizó durante una hora a 4°C con BSA al 1% en PBS previo a la incubación con anticuerpo primario. Las incubaciones con anticuerpo primario y secundario se llevaron a cabo durante 1 hora a 4°C en oscuridad, y estuvieron separadas por lavados en series de tres, con agitación suave en PBS a 4°C durante 5 minutos cada uno. Los anticuerpos secundarios utilizados llevaban acoplado un fluorocromo Alexa 488 (emisión en verde) o Alexa 647 (emisión en rojo lejano) según el caso (Molecular Probes, Invitrogen). Para la visualización de los núcleos, se incubaron los cubreobjetos durante 5 minutos a 4°C con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a concentración 10 mg/mL en PBS-BSA-1%. Este agente intercalante tiñe el ADN y emite fluorescencia azul al ser irradiado con luz ultravioleta. Por último, el montaje se realizó colocando los cubreobjetos por el lado que contenía las células sobre portaobjetos con una gota con resina Prolong (Invitrogen). El análisis se llevó a cabo en un microscopio láser de fluorescencia, con óptica confocal espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania).

## **12 Modelo de daño mecánico del endotelio *in vivo***

---

Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se les practicó daño endoluminal bilateral en la arteria femoral pasando tres veces un alambre guía de angioplastia de 0.25 mm de diámetro como se ha descrito (Roque y col., 2000). Tras 28 días, los animales fueron sacrificados y perfundidos *in situ* con 5 mL de PBS seguido de 10 mL de paraformaldehído 4% en PBS usando una bomba peristáltica a un flujo aproximado de 1 mL/min. Los miembros traseros fueron aislados y se continuó la fijación durante 24-48 horas. Después, los especímenes fueron descalcificados durante 24 horas con Osteodec (Bio-Optica, Milán, Italia) a temperatura ambiente con agitación suave. Tras lavados con PBS, segmentos de aproximadamente 2 mm de grosor se tomaron transversalmente en la zona del daño, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de unos 5  $\mu$ m de espesor. Para el estudio se utilizaron cinco ratones dañados y dos ratones control (no dañados). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Mercè Roqué Moreno (*Servei de Cardiologia, Institut del Tòrax, Hospital Clínic, Barcelona*).

### 13 Marcaje de proteínas sobre tejido por técnicas de inmunohistoquímica

Las muestras procedentes de secciones de hígado de ratón embebidas en parafina de ratones KLF6<sup>+/+</sup> y KLF6<sup>+/-</sup> fueron facilitadas por el laboratorio del Dr. Scott L. Friedman (*Department of Liver Diseases, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY*) y generadas tal y como se ha descrito (Matsumoto y col., 2006).

Los portaobjetos con las secciones embebidas en parafina se desparafinaron mediante precalentamiento en estufa a 60°C durante una hora, seguido de dos inmersiones de diez minutos en xilol. Se utilizó una batería de alcoholes para hidratar los cortes previamente a la inmunotinción consistente en dos inmersiones de 5 min cada una en el siguiente orden: etanol 100%, etanol 96%, etanol 70%, y etanol 50%. Después se sumergieron en PBS pH 7,6 durante 10 minutos. Para el desenmascaramiento antigénico se sumergieron las muestras en una cubeta de tampón citrato sódico al 0,01M pH 6 previamente atemperado por inmersión en baño maría y se mantuvo la incubación en citrato al baño maría durante 45 minutos. Después, la cubeta de citrato -conteniendo las muestras- se dejó enfriar lentamente apartada del baño. Se marcaron las secciones con un rotulador hidrofóbico (*DakoPen*, Dako Diagnostics) y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con el reactivo de bloqueo del sistema comercial *Novolink polymer detection system Novocastra* (suero de cabra, Ref RE7290-K. Leica Microsystems AG) durante cinco minutos a temperatura ambiente. Tras lavados con PBS, se bloquearon las uniones inespecíficas con el reactivo de bloqueo proteico del mismo sistema comercial (Caseína al 0,4% en PBS) durante media hora a temperatura ambiente. Tras lavados con PBS se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal de rata anti-ALK1 de ratón (Ref. CMA106, Cell Sciences) a concentración final 20 ng/μl en PBS-BSA 1% a 4°C en cámara húmeda. Como control negativo se utilizó un anticuerpo tipo IgG<sub>2A</sub> irrelevante a la misma concentración. Después se lavó el primario, se bloqueó con el reactivo de bloqueo post-primario aportado por la casa comercial (suero animal al 10% v/v en PBS) durante media hora a temperatura ambiente y se incubó con el secundario: anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de rata (H+L) marcado con biotina (Ref. 20697, Molecular Probes, Invitrogen) a concentración 4 ng/μl en PBS-BSA 1% durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras lavados enérgicos en PBS se incubó con Streptavidina-HRP (Ref. 21126, Pierce) a concentración 2 ng/μl en PBS-BSA 1% durante media hora a temperatura ambiente. Se eliminaron los restos de marcaje inespecífico con lavados enérgicos con PBS y se reveló la actividad peroxidasa de la HRP mediante incubación con el sistema DAB (3-3'-diaminobencidina, Dako Diagnostics) durante cinco minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró lavando con agua destilada. Se contrastó la tinción de los núcleos celulares

mediante tinción con hematoxilina de Mayer al 0,02% (Sigma Aldrich) durante un minuto y se intensificó mediante inmersión instantánea en agua amoniaca. Las muestras ya teñidas se deshidrataron de nuevo mediante la batería de alcoholes hecha a la inversa e inmersión en xilol durante diez minutos por duplicado. Se montaron las muestras en el medio de montaje HiMo (Bio-Optica).

## 14 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Las células HUVEC se sembraron en placas de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de diámetro y se esperó hasta confluencia. Se utilizaron dos condiciones: las células control, y las células sometidas a daño, mediante el procedimiento de *wound healing* anteriormente descrito. Básicamente, se realizaron múltiples heridas a lo largo de toda la placa, con el objetivo de dañar el mayor número posible de células endoteliales, y cambiando el medio inmediatamente.

Material  
y  
métodos

Una vez transcurridas 3 horas de la producción de las heridas, las placas de ambas condiciones celulares se fijaron con formaldehído al 1% en medio de cultivo Optimem (Gibco). Para la inmunoprecipitación de cromatina se utilizó la batería comercial de reactivos ChIP-it Express (Active Motif, Rixensart, Bélgica). La reacción de fijación se paró con la solución comercial de glicina, y las células se rasparon en presencia del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), lisándose después con el tampón de lisis comercial. Los núcleos fueron separados usando un homogeneizador de cristal y posteriormente digeridos con un combinado enzimático durante 5, 10 y 15 minutos. Se determinó que el tiempo óptimo de digestión enzimática para obtener fragmentos de ADN genómico de aproximadamente 200 pares de bases fue 15 minutos. Una alícuota de esta cromatina digerida se guardó para usarse como *input* (lisado nuclear total o cromatina no inmunoprecipitada). El resto, fue incubada con bolitas magnéticas acopladas a proteína G y a la mezcla policlonal de anticuerpos de conejo anti-Sp1 humano (Tabla 7), en el tampón adecuado, conteniendo inhibidores de proteasas aportadas por el fabricante. Como control positivo, se realizó en paralelo la inmunoprecipitación con Histona 3 (ab8580, Abcam) y, como control negativo, con un combinado de IgG de conejo anti-humano. Los inmunocomplejos se formaron durante toda la noche formándose en un agitador orbital a 4°C. Tras ese periodo, las bolitas magnéticas fueron centrifugadas y recogidas para su lavado y elución con el tampón proporcionado por el fabricante. Después, el entrecruzamiento creado por el formaldehído entre las proteínas nucleares y la cromatina se revirtió mediante calentamiento a 94°C y posteriormente las

muestras se trataron con NaCl 100 mM y proteinasa K durante 1 hora a 37°C. La actividad de la proteinasa K se paró y las muestras se centrifugaron. Los sobrenadantes se utilizaron para la detección de los fragmentos de ADN inmunoprecipitados mediante amplificación por PCR a una temperatura de anillamiento de 59°C. Los cebadores empleados se seleccionaron de tal modo que mapearan cuatro regiones del promotor de ALK1, solapándose entre sí, amplificando las regiones siguientes: de -1,032 a -844 (188 pb); de -864 a -662 (202 pb); de -510 a -260 (250 pb) y de -200 a +40 (240 pb). Sus secuencias se muestran en la Tabla 9. Para los controles negativos y positivos de PCR, se usaron los cebadores provistos con el producto comercial ChIP-IT *control kit human* (Ref. 53010, Active Motif).

USO	NOMBRE	SECUENCIA	Materiales y métodos
Cebadores PCR-ChIP	1ª región Fw (-1032/-1012)	5'-CCAGAAGGCTAGGACTAAGA-3'	
	1ª región Re (-844/-864)	5'-CTCCCTGGAAGCTGCTGAC-3'	
	2ª región Fw (-864/-844)	5'-GTCAGCAGAGTCCAGGGAG-3'	
	2ª región Re (-662/-682)	5'-TTAGCCCTGAGGATGTTTG-3'	
	3ª región Fw (-510/-490)	5'-AAAACGCATCTGGATTTTGC-3'	
	3ª región Re (-260/-280)	5'-GAGCCGAGACTGTAGGCAAC-3'	
	4ª región Fw (-200/-180)	5'-CCCACGGCCTGAGTCCAAGG-3'	
	4ª región Re (+20/+40)	5'-GGCCCAGCTCCTCCACTCC-3'	

**Tabla 9. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR posterior a la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).** Las abreviaturas empleadas son: Fw, cebador en sentido 5'-3' (del inglés *forward*); Re, cebador en sentido 3'-5', complementario reverso (del inglés *reverse*).

## 15 Ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA)

### 15.1 EMSA de elementos de respuesta a Sp1 en el promotor de ACVRL1

Los extractos nucleares de células HeLa fueron obtenidos de Promega (Ref. E3521). Las sondas se diseñaron en la región -89/-56 del promotor de ALK1, abarcando dos sitios consenso para Sp1. Se diseñaron cuatro parejas de sondas de ADN de doble cadena (ADNds, del inglés, *double stranded*): I) Secuencia original; II) Con mutación en las posiciones -84/-78; III) Con mutación -67/-62; IV) Con mutación en ambos sitios. Las secuencias se muestran en la Tabla 10. Las sondas se sintetizaron anillando los dos oligonucleótidos complementarios de las cadenas 5'-3' y 3'-5', en concentración 50 ng/μl cada uno, mediante calentamiento a 95°C durante cinco minutos y bajada progresiva de la temperatura hasta 4°C en tampón de anillamiento M (Roche Diagnostics). El marcaje radiactivo de la sonda con la secuencia original se realizó marcando el extremo 5' de cada una de las cadenas de oligonucleótido con



[ $\gamma$ <sup>32</sup>P]dATP y la polinucleótido quinasa del fago T4 a 37°C durante una hora. Aproximadamente, 5 ng (100,000 cpm) de cada sonda se incubaron con 10 µg del extracto nuclear para cada condición y con 2 µg de poli (dI-dC) como competidor inespecífico (para eliminar proteínas que puedan unirse de modo inespecífico al ADN por interacciones electrostáticas) durante 30 min a 4°C. Para los ensayos de competición específica, la misma sonda sin marcar o las sondas mutadas sin marcar, en cada caso, se añadieron a la reacción a una concentración cien veces superior a la marcada radiactivamente. Para la identificación específica del factor unido a la sonda, se realizaron ensayos de superretardo por adición de anticuerpo (*supershift*), el lisado proteico nuclear de células HeLa se incubó con 1 µg de anticuerpo anti-Sp1, anti-Sp3 o anti-NFKB (Tabla 7) durante una hora a 4°C previamente a la adición del resto de componentes de la reacción de unión. Como control positivo, para localizar la posición de la banda correspondiente a Sp1, se realizó en paralelo un ensayo de unión con una sonda de la misma medida en número de pares de bases del promotor de Endogлина (-50/-24), con sitios Sp1 previamente descritos y funcionalmente comprobados (Botella y col., 2001). Las reacciones de unión de proteínas nucleares a la sonda de ADN se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% en TBE en condiciones no desnaturizantes (sin SDS) a 4°C. El gel se secó por calor y las bandas se visualizaron por autorradiografía.

## 15.2 EMSA de elementos de respuesta a hipoxia en el promotor de ACVRL1

El procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente pero utilizando extractos nucleares de células COS-7 tratadas con CoCl<sub>2</sub> obtenidas de la casa comercial Active Motif (Ref. 40600). Las sondas fueron diseñadas en las zonas del promotor que poseen sitios putativos de unión a HIF-1α: (-1.351/-1.303), (-823/-780), (-300/-250) y (-242/-215), según los resultados obtenidos en el análisis *in silico*. Además, la sonda -300/-250 incluye también un sitio SBE (*Smad binding element*). Para las competiciones, se mutaron los sitios HRE (*Hypoxia responsive element*) y también el sitio SBE de la sonda correspondiente. En este caso, se emplearon geles de poliacrilamida al 5% en TBE en condiciones no desnaturizantes. Todas las sondas mostradas en resultados se detallan en la Tabla 10 (las sondas HRE2 y HRE4 no se detallan puesto que no se muestran los EMSAs correspondientes). Para los ensayos de *supershift* se utilizaron los anticuerpos descritos en la Tabla 7.

USO	NOMBRE	REGIÓN	SITIOS	TIPO	SENT	SECUENCIA 5'-3'
Sondas ADNds EMSA	WT Sp1 <sub>A</sub> /Sp1 <sub>B</sub> pALK1	-101/-67	Sp1 <sub>A</sub> (-84/-78) Sp1 <sub>B</sub> (-67/-62)	WT	Fw	CTGAGGGGCTGGGAGCGGCGGGGGTGGGTCCC
				WT	Re	GGGACCCACCCCGCGCCGCTCCAGCCCCTCAG
	Mut Sp1 <sub>A</sub> pALK1	-101/-67	Sp1 <sub>A</sub> (-84/-78) Sp1 <sub>B</sub> (-67/-62)	Mut	Fw	CTGAGTTTTTTGGAGCGGCGGGGGTGGGTCCC
				WT	Re	GGGACCCACCCCGCGCCGCTCAAAAAAAGTCTCAG
	Mut Sp1 <sub>B</sub> pALK1	-101/-67	Sp1 <sub>A</sub> (-84/-78) Sp1 <sub>B</sub> (-67/-62)	WT	Fw	CTGAGGGGCTGGGAGCGGCGGTTTTTTGTCCC
				Mut	Re	GGGACAAAAAACGCGCCGCTCCAGCCCCTCAG
	Mut Sp1 <sub>A</sub> /Sp1 <sub>B</sub> pALK1	-101/-67	Sp1 <sub>A</sub> (-84/-78) Sp1 <sub>B</sub> (-67/-62)	Mut	Fw	CTGAGTTTTTTGGAGCGGCGGTTTTTTGTCCC
				Mut	Re	GGGACAAAAAACGCGCCGCTCAAAAAAAGTCTCAG
	WT Sp1 pENG	-50/-24	(Botella y col., 2001)	WT	Fw	GCAGGCGGCTGGGCCAGCCCCTTCTC
					Re	GAGAAGGGGCTGGGCCAGGCCGCTGC
	WT HRE <sub>1</sub> pALK1	-1.351/-1.303	HRE <sub>1</sub> (-1.339/-1.325)	WT	Fw	CTCCTGCTTCTAATACCCAGCTCTTTCCAAGTGTCTCTG AGGCCACCC
					Re	GGGTGGCCTCAGAGACACTTGGAAGACGTGGGTATT AGAAGCAGGAG
	Mut HRE <sub>1</sub> pALK1	-1.351/-1.303	HRE <sub>1</sub> (-1.339/-1.325)	Mut	Fw	CTCCTGCTTCTAATACCATCTCTTTCCAAGTGTCTCTGA GGGCCACCC
					Re	GGGTGGCCTCAGAGACACTTGGAAGATGAGGTATT AGAAGCAGGAG
	WT HRE <sub>3</sub> /Smad4 pALK1	-300/-250	HRE <sub>3</sub> (-288/-271) Smad4 (-269/-261)	WT	Fw	CCACTACTCCGGCCGCCAGCTATAGCTACAGTCTCGG CTCTGTCTCCCA
				WT	Re	TGGGAGACAGAGCCGAGACTGTAGGCAACGTCTGGCG GCCGGAGTAGTGG
	Mut HRE <sub>3</sub> pALK1	-300/-250	HRE <sub>3</sub> (-288/-271) Smad4 (-269/-261)	Mut	Fw	CCACTACTCCGGCCGCCAGCTATAGCTACAGTCTCGG CTCTGTCTCCCA
				WT	Re	TGGGAGACAGAGCCGATGTGTAGGCAACGTCTGGCG GCCGGAGTAGTGG
	Mut Smad4 pALK1	-300/-250	HRE <sub>3</sub> (-288/-271) Smad4 (-269/-261)	WT	Fw	CCACTACACCGCCGCCAGCTATAGCTACACATACGG CTCTGTCTCCCA
				Mut	Re	TGGGAGACAGAGCCGTATGTGTAGGCAACGTCTGGCG GCCGGAGTAGTGG
	Mut HRE <sub>3</sub> /Smad4 pALK1	-300/-250	HRE <sub>3</sub> (-288/-271) Smad4 (-269/-261)	Mut	Fw	CCACTACTCCGGCCGCCAGCTATAGCTACACATACGG CTCTGTCTCCCA
				Mut	Re	TGGGAGACAGAGCCGTATGTGTAGGCTATGACTGGCG GCCGGAGTAGTGG

Materiales y métodos

**Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de las sondas de ADN utilizadas en los ensayos de movilidad electroforética retardada (EMSA).** Las abreviaturas empleadas son: WT, sonda de ADN con la secuencia de nucleótidos original en el promotor de ALK1 (del inglés *wild type*); Mut, sondas de ADN competidoras cuyos sitios han sido mutados. Los nucleótidos en negrita hacen referencia a las posiciones mutadas respecto a la secuencia original.

## 16 Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media), calculado como  $SEM=SD/\sqrt{n}$ , donde  $SD$  es la desviación estándar, y  $n$  es el número de muestras). Las diferencias entre las medias se analizaron usando el estadístico  $t$  de Student. En las figuras, los valores de significación estadística se señalan según el siguiente código: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; y \*\*\* $p<0,005$ . La abreviatura *ns* hace referencia a resultados no significativos.

## RESULTADOS

## IV. RESULTADOS

### 1 Caracterización de la región promotora de *ACVRL1* y estudio de su regulación por Sp1

---

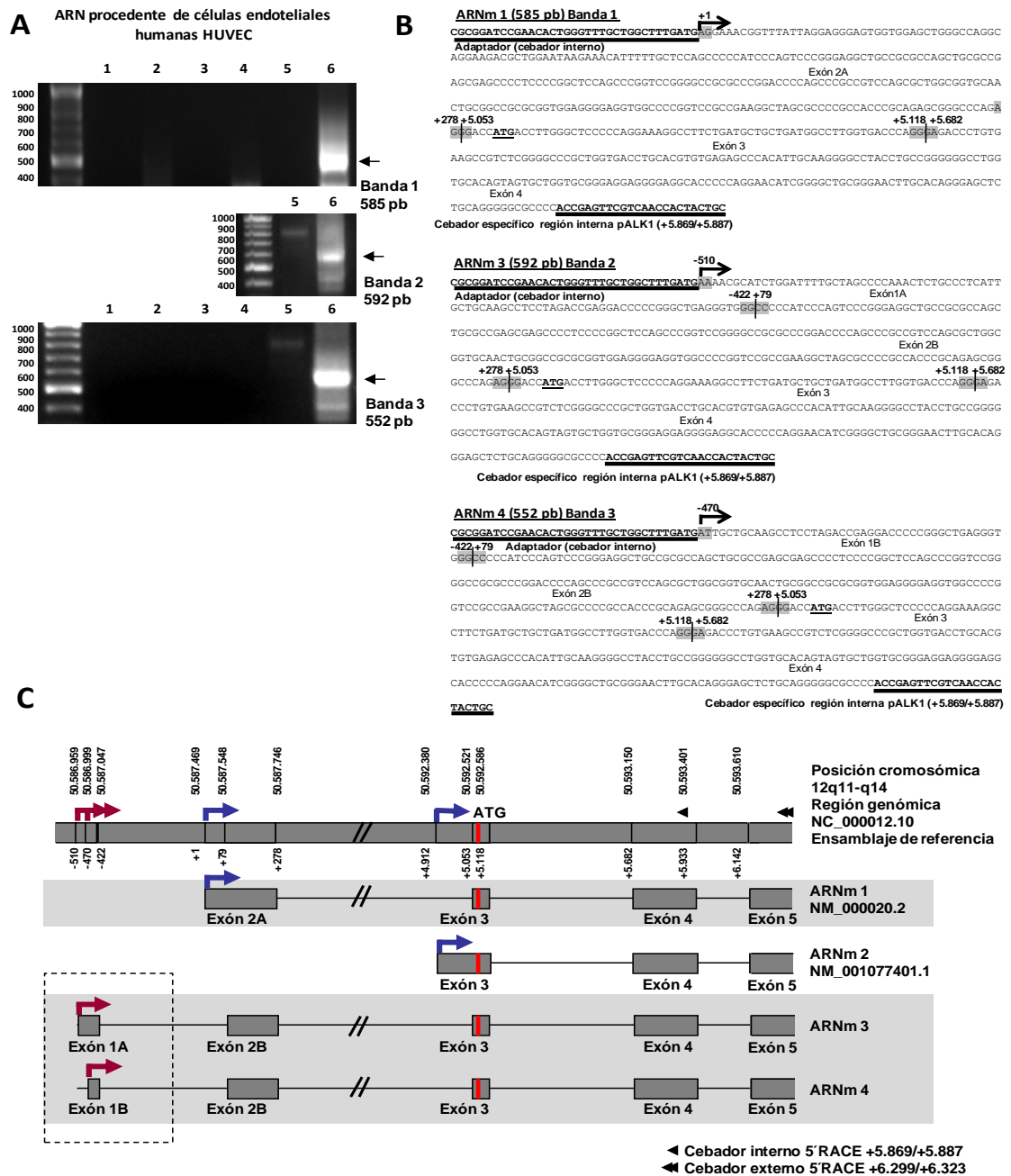
#### 1.1 Identificación de dos nuevos inicios de transcripción y de una nueva región exónica en la zona 5'-proximal en el gen *ACVRL1*

---

Para caracterizar los orígenes de transcripción del gen *ACVRL1* en células endoteliales, se realizaron experimentos de 5'RACE sobre ARNm procedente de células HUVEC. Como resultado, se obtuvieron tres tipos de productos de PCR de diferente tamaño correspondientes a tres inicios de transcripción distintos. Más del 50% de los clones obtenidos correspondieron al ARNm 1 previamente descrito en placenta (ten Dijke y col., 1993), mientras que dos nuevos tipos de ARNm fueron identificados en varios clones de experimentos independientes. Una vez estudiada su secuencia se denominaron ARNm 3 y ARNm 4. En la Figura 15 se muestran las bandas obtenidas en las PCR anidadas, su tamaño, así como las secuencias de ARNm obtenidas de cada una de ellas, y su situación en la secuencia génica de *ACVRL1*. Sorprendentemente, los dos nuevos inicios de transcripción (TSS, *transcriptional start sites*) correspondientes a dichos ARNm 3 y 4 se localizan en posiciones anteriores al TSS previamente descrito (+1), de tal modo que dan lugar a una región exónica no descrita hasta la fecha. Así, los exones de *ACVRL1* pasan a ser once en lugar de diez. El exón 1 pasa a denominarse exón 2 (2A en el caso del ARNm 1 y 2B en el caso de los ARNm 3 y ARNm 4) y el nuevo exón es el exón 1 (1A en el caso del ARNm 3 y 1B en el caso del ARNm 4). El exón donde se localiza el ATG y que es el mismo para los ARNm 1, ARNm 2, ARNm 3 y ARNm 4 pasa a ser el exón 3 en lugar del exón 2. La numeración desde el TSS +1 se mantiene debido a que los resultados experimentales indican que se trata del inicio de transcripción predominante (una mayoría de clones proceden de la transcripción iniciada en dicho punto).

El ARNm 1 (*GenBank*: NM\_000020.2) comienza la transcripción en el TSS +1 con un exón de 278 pares de bases (pb), que es el exón 2A. Después, sufre el ajuste alternativo (*splicing*) de un intrón de aproximadamente 5 kilobases (kb) y continúa con la secuencia exónica que contiene el codón de inicio de traducción ATG. Este exón que contiene el ATG se consideraba el exón 2, pero los resultados obtenidos en esta tesis hacen que pase a ser el exón 3.

Resultados



Resultados

**Figura 15. Amplificación de extremos 5' de ADN complementario (5'RACE) de transcritos de ACVRL1 en células HUVEC.** **A.** Análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos en las PCR anidadas. Carriles: 1 y 2 (sin muestra; 1-PCR y 2-PCR anidada), 3 y 4 (ARN sin tratamiento con CIP/TAP; 3-PCR y 4-PCR anidada), 5 y 6 (ARN tratado con CIP/TAP; 5-PCR y 6-PCR anidada). **B.** Secuencias correspondientes a los tres tipos de bandas obtenidas. Los cebadores empleados se encuentran subrayados. Las regiones sombreadas en gris indican las uniones entre diferentes exones. El transcrito predominante correspondió al ARNm 1 previamente descrito en placenta. Dos nuevas variantes de ARNm de ACVRL1 se describen en esta tesis y sus secuencias han sido inscritas en el registro GenBank identificadas como HM161905 (ARNm 3) y HM161906 (ARNm 4). Las numeraciones hacen referencia a la secuencia genómica desde la posición +1 previamente descrita. Las secuencias de las tres isoformas son idénticas a partir de la posición +79. **C.** Representación esquemática de la región 5' de los transcritos y su correspondencia con la secuencia genómica. Los transcritos hallados en el experimento de 5'RACE en HUVEC en el trabajo de esta tesis se han sombreado en gris (ARNm 1, ARNm 3 y ARNm 4). La nueva región exónica descubierta se indica por el recuadro de línea discontinua. Todas las isoformas conservan la primera metionina (ATG) en la misma posición y en marco de lectura por lo que generan la misma proteína de 503 aminoácidos. Considerando la nueva secuencia exónica descubierta, el gen ACVRL1 se reordena en 11 exones en lugar de 10, comenzando el exón 1 en la posición -510 (variante 1A) o -470 (variante 1B). Además, lo que se consideraba hasta la fecha como exón 1 pasa a denominarse exón 2 (en sus variantes 2A y 2B). Las flechas rojas indican los dos nuevos TSS (Transcriptional Start Sites) y las flechas azules los dos TSS previamente descritos en la literatura (Ten Dijke y col., 1993; Attisano y col., 1993).

El ARNm 2 (*GenBank*: NM\_001077401.01) no tiene exón 2A, y su exón 3 es un poco más largo por la región 5', conteniendo un fragmento adicional de 141 pb. El ATG se mantiene en marco de lectura y por tanto da lugar a la misma proteína de 503 aminoácidos que el ARNm 1.

Los mensajeros obtenidos en el trabajo de esta tesis corresponden a las variantes ARNm 3 y ARNm 4 y las secuencias de ADNc correspondientes han sido depositadas en la base de datos del *GenBank* con los números de acceso HM161905 y HM161906, respectivamente.

## 1.2 El promotor de *ACVRL1* carece de cajas generales de transcripción (TATA/CAAT) y posee múltiples sitios consenso de unión para Sp1

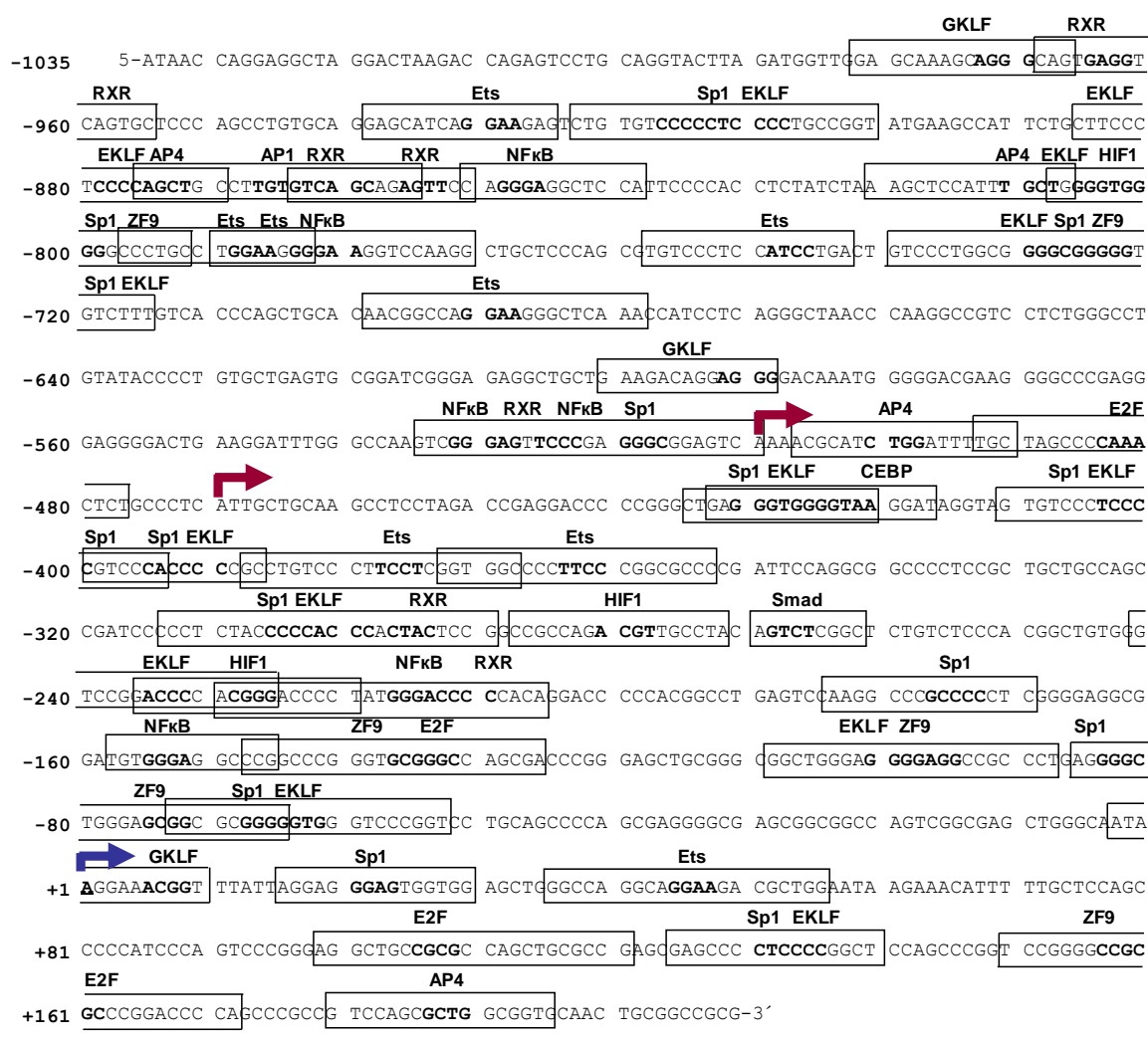
El gen *ACVRL1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q11-q14) (Berg y col., 1997). El análisis de la región promotora se centró en un fragmento de 1.245 pb del extremo 5' proximal del gen, comprendido entre las posiciones -50.586.434 y -50.587.679 de la región genómica (*contig*) (*GenBank*: NT\_029419). Dicho fragmento corresponde a las posiciones -1.035/+210 y carece de cajas consenso de inicio de transcripción TATA (5'-TATAAA-3') y CAAT (5'-GGNCAATCT-3') en las posiciones -25 y -75/-80, respectivamente. La secuencia fue sometida a un análisis predictivo teórico (análisis *in silico*) mediante la herramienta informática Genomatix MatInspector, el cual puso de manifiesto el elevado contenido de regiones ricas en GC (guanina y citosina), así como múltiples sitios teóricos de reconocimiento para factores de transcripción, entre los cuales destacó la alta frecuencia de sitios Sp1. Los resultados se muestran en la Figura 16 y en la Tabla 11. Catorce sitios Sp1 teóricos se hallan distribuidos a lo largo de la secuencia -1.035/+210, en las posiciones: -810/-796, -734/-720, -728/-714, -524/-510, -435/-421, -88/-74, -40/-56 y -15/-30 en la hebra 5'-3', y en las posiciones: -919/-905, -411/-397, -401/-387, -309/-295, -18/-170 y +124/+139 en la hebra 3'-5'. Todos los sitios mostraron un alto coeficiente de similitud con la matriz teórica (matriz generada por la herramienta informática a partir de sitios en distintos promotores en los que se ha comprobado la unión de un determinado factor), representado por un valor de puntuación (*score*) > 0,85 (cuyo valor oscila entre 0-1). Otro consenso que aparece ampliamente representado en la secuencia del promotor de *ACVRL1* es el correspondiente a la familia de factores de transcripción KLF, entre los que se encontraron catorce sitios KLF1, tres sitios KLF4, y seis sitios KLF6. El resto de secuencias halladas en el promotor de *ACVRL1* y que presentaron gran similitud con los consensos teóricos fueron: tres sitios para el factor AP-1 (*Activator protein-1*), tres sitios para el factor AP4, un sitio para CEBP (*CCAAT-Enhancer Binding protein*), ocho sitios Ets (*E26-Transformation-Specific transcription factor*), cinco secuencias E2F (*Elongation factor 2*), siete sitios para el factor NFkB (*Nuclear Factor of kappa light polypeptide*

*gene enhancer in B-cells*), siete sitios para el receptor nuclear de ácido retinoico (RXR) y, dos factores muy interesantes por su relación con la biología endotelial: un sitio Smad (SBE, *Smad Binding Element*) en la posición -269/-261, y tres sitios para HIF-1 $\alpha$  en las posiciones -808/-791, -288/-271 y -236/-220.

FAMILIA	INICIO	FIN	CADENA	SIMILITUD	SIMILITUD	FAMILIA	INICIO	FIN	CADENA	SIMILITUD	SIMILITUD
				CON LA	CON EL					CON LA	CON EL
				MATRIZ	CONSENSO					MATRIZ	CONSENSO
AP1	-875	-855	-	0.823	1.0	HIF	-808	-792	+	0.85	0.9
	-873	-853	+	0.899	0.813		-286	-274	+	0.885	1.0
	-871	-851	-	0.994	1.0		-236	-219	-	0.843	0.75
AP4	-881	-865	-	0.923	1.0	NFKB	-851	-839	+	0.901	1.0
	-820	-804	-	0.87	0.882		-786	-774	+	0.852	1.0
	-506	-490	-	0.961	1.0		-784	-772	-	0.919	1.0
	+179	+195	-	0.855	1.0		-534	-522	+	0.985	1.0
CEBP	-432	-418	+	0.945	0.971		-533	-521	-	0.947	1.0
	-918	-902	-	0.924	1.0		-220	-208	+	0.84	1.0
EKLF/ KLF1	-886	-870	-	0.911	1.0	RXR	-158	-146	+	0.838	1.0
	-808	-792	+	0.975	1.0		-979	-955	+	0.954	1.0
	-737	-721	+	0.932	1.0		-871	-847	+	0.758	0.771
	-731	-715	+	0.917	1.0		-864	-840	+	0.818	0.824
	-433	-417	+	0.977	1.0		-535	-511	+	0.847	0.952
	-410	-394	-	0.933	1.0		-441	-417	+	0.763	0.812
	-405	-389	-	0.95	1.0		-314	-290	-	0.819	0.81
	-313	-297	-	0.974	1.0		-230	-206	-	0.791	0.905
	-241	-225	-	0.916	1.0	SMAD	-270	-262	+	0.969	1.0
	-107	-91	+	0.923	1.0		-919	-905	-	0.901	0.807
	-73	-57	+	0.916	1.0		-810	-796	+	0.885	0.872
	-68	-52	+	0.971	1.0		-734	-720	+	0.997	1.0
ETS	+125	+141	-	0.947	1.0		-728	-714	+	0.879	1.0
	-939	-919	+	0.961	1.0	SP1	-524	-510	+	0.913	1.0
	-797	-777	+	0.922	1.0		-435	-421	+	0.881	0.872
	-791	-771	+	0.965	1.0		-411	-397	-	0.89	0.807
	-758	-738	-	0.943	1.0		-401	-387	-	0.895	0.872
	-699	-679	+	0.972	1.0		-309	-295	-	0.891	0.872
	-388	-368	-	0.945	1.0		-184	-170	-	0.98	1.0
	-373	-353	-	0.914	1.0		-88	-74	+	0.885	1.0
	+36	+56	+	0.927	1.0		-70	-56	+	0.892	0.872
E2F	-493	-477	+	0.849	1.0		+15	+30	+	0.987	1.0
	-143	-127	-	0.861	0.81	ZF9/ KLF6	+124	+139	-	0.93	0.877
	+98	+114	-	0.971	1.0		-815	-793	-	0.891	0.923
	+99	+115	+	0.964	1.0		-739	-717	-	0.899	1.0
GKLF/ KLF4	+150	+166	-	0.875	1.0		-148	-126	-	0.881	1.0
	-981	-969	+	1.000	0.862		-109	-87	-	0.897	0.821
	-600	-588	+	1.000	0.883		-86	-64	-	0.879	1.0
	-3	+9	+	0.770	0.868		+150	+172	+	0.936	1.0

Resultados

**Tabla 11. Principales sitios teóricos de reconocimiento por factores de transcripción hallados en la región promotora de ACVRL1.** Se muestra la posición de cada uno de los sitios hallados respecto al TSS +1. La similitud con la matriz hace referencia a la similitud del sitio concreto con otros sitios funcionales para dicho factor hallados en diversos promotores (oscila entre 0-1). La similitud con el consenso hace referencia a las cuatro posiciones centrales del sitio y las compara con los residuos más conservados para dicho consenso (0-1). Las abreviaturas son: AP1, *Activator Protein 1*; AP4, *Activator Protein 4*; CEBP, *CCAAT/Enhancer Binding Protein*; EKLF, *Erythroid Krüppel-Like Factor*; ETS, *E26-Transformation-Specific transcription factor*; E2F, *Elongation Factor 2*; GKLF, *Gut-related Krüppel-Like Factor*; HIF, *Hypoxia Inducible Factor*; NFKB, *Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*; RXR, *Retinoid X Receptor*; SMAD, *Sma y Mad-related*; SP1, *Specificity Protein 1*; ZF9, *Krüppel-like Zinc Finger protein 9*.



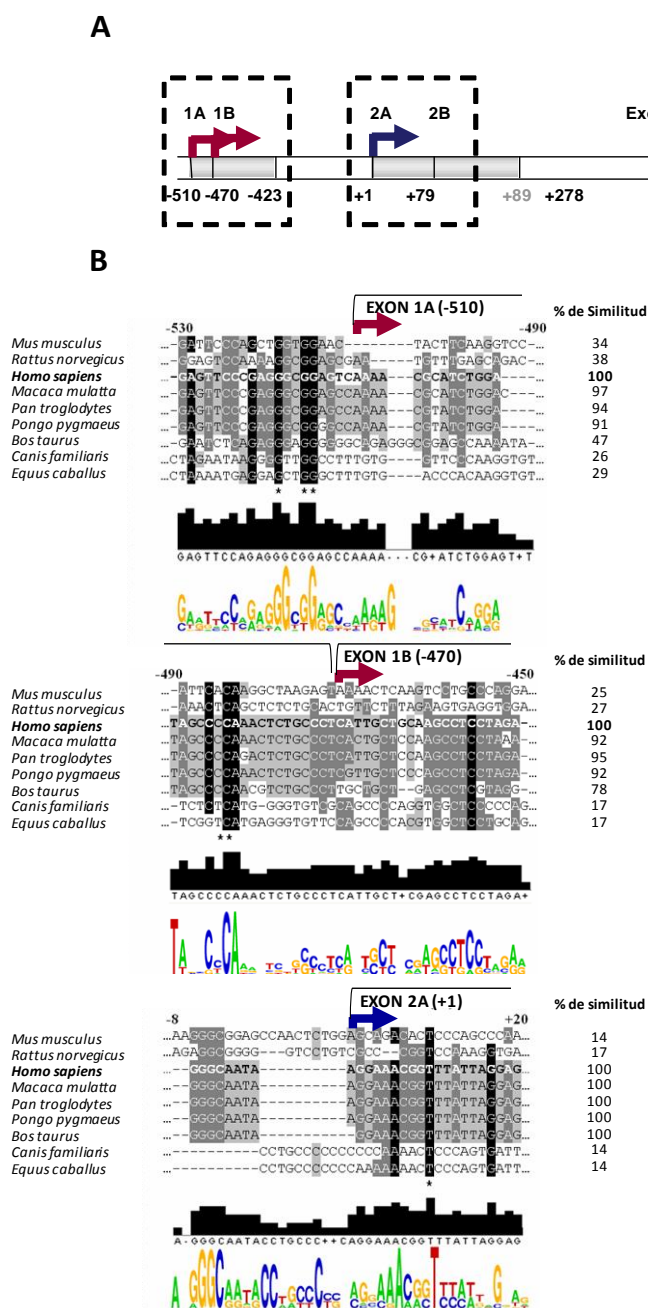
Resultados

### 1.3 La región promotora 5'-proximal del gen *ACVRL1* está altamente conservada

Para evaluar la importancia de cada sitio de inicio de transcripción, se analizaron las secuencias promotoras de los genes ortólogos al gen *ACVRL1* humano en varias especies de mamíferos (ratón, rata, toro, orangután, mono rhesus, caballo, chimpancé y perro) mediante el programa de alineamiento ClustalW2. Para los alineamientos se seleccionó la misma región que se utilizó para el análisis *in silico* del promotor humano, la región comprendida entre las posiciones -1.035/+210 respecto al inicio de transcripción +1 descrito en cada especie. La Figura 17 muestra el análisis comparativo de todas las secuencias en las cercanías al +1. La región del TSS +1 presenta una secuencia (AGGAAACGG) con un alto grado de conservación entre primates con porcentajes de similitud del 100% entre humano, orangután, chimpancé,



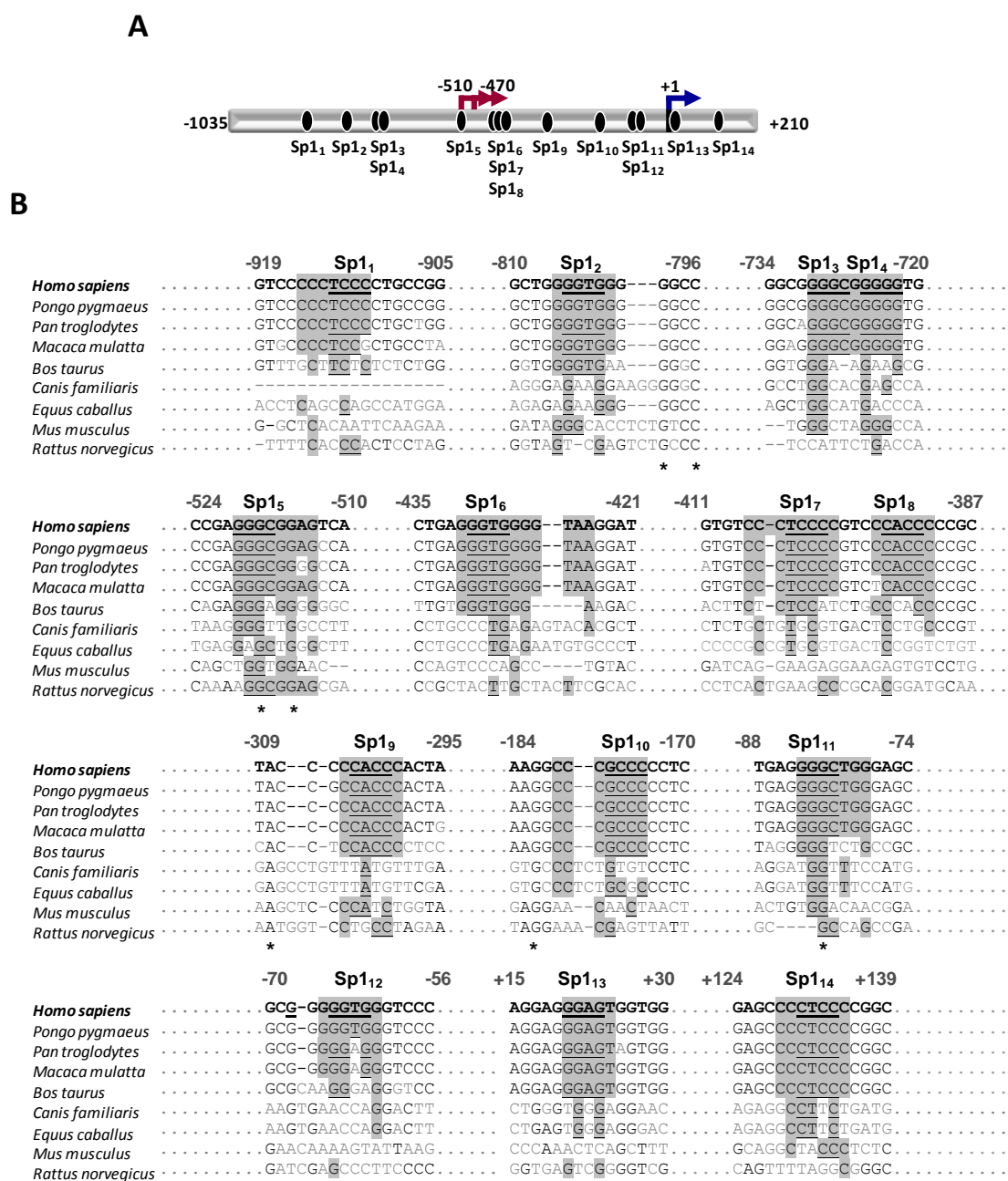
mono Rhesus, e incluso toro), lo que apoya su importancia como sitio principal de inicio. Las secuencias de los dos nuevos sitios de inicio de transcripción identificados (AAAACGC en el sitio de inicio -510, correspondiente al ARNm 3 y ATTGCT en el sitio de inicio -470, correspondiente al ARNm 4) están conservadas únicamente en los primates, y con un grado de similitud algo menor que el presentado por el sitio +1 (alrededor del 90%).



Resultados

**Figura 17. Alineamiento de las secuencias de los inicios de transcripción del gen ACVRL1 entre distintas especies de mamífero. A.** Esquema de las distintas regiones de la secuencia humana elegidas para el alineamiento. La flecha azul indica el inicio de transcripción +1. Las flechas rojas indican los dos nuevos inicios de transcripción descritos en la Figura 15 (-470 y -510). **B.** Secuencias génicas de ACVRL1 de ratón, rata, mono rhesus, chimpancé, orangután, toro, perro y caballo fueron comparadas con la secuencia -1.035/+210 humana. Las secuencias se eligieron identificando el +1 en cada especie y seleccionando la región -1.035/+210 del gen ACVRL1 y sus posiciones en los genomas correspondientes se indican en la sección “Materiales y Métodos”.

Otro aspecto relevante, antes de comprobar la funcionalidad de los sitios Sp1, fue analizar su grado de conservación entre especies.



Resultados

**Figura 18. Comparación de los distintos consensos de unión de Sp1 localizados en el promotor de ACVRL1 humano con otras especies.** **A.** Representación esquemática de la localización de los 14 sitios consenso para Sp1 hallados en el análisis *in silico* del fragmento -1.035/+210 del promotor de ACVRL1. Las flechas rojas indican los nuevos TSS descritos (-510 y -470) y la flecha azul el TSS conocido previamente (+1). **B.** Alineamiento de las secuencias de los consensos hallados con las secuencias de otras especies de mamíferos. La numeración hace referencia al inicio de transcripción +1. Los asteriscos indican los residuos totalmente conservados entre especies. Los alineamientos de los sitios Sp1 se muestran en sombreado gris. Todos los nucleótidos de la secuencia humana seleccionados para el alineamiento tienen un valor de similitud con el consenso > 60 (que representa el grado de conservación de cada posición en la matriz, en escala 0-100). Los núcleos de cada consenso se encuentran subrayados.

Se repitió el alineamiento de la secuencia génica de *ACVRL1* entre distintas especies en las regiones en las que se detectaron sitios consenso para unión a Sp1 como se muestra en la Figura 18 y el grado de conservación obtenido en la mayoría de los sitios fue muy alto. Esto hace pensar en su importancia como reguladores de la transcripción de *ACVRL1* y fue el primer paso para continuar su posterior análisis en mayor detalle.

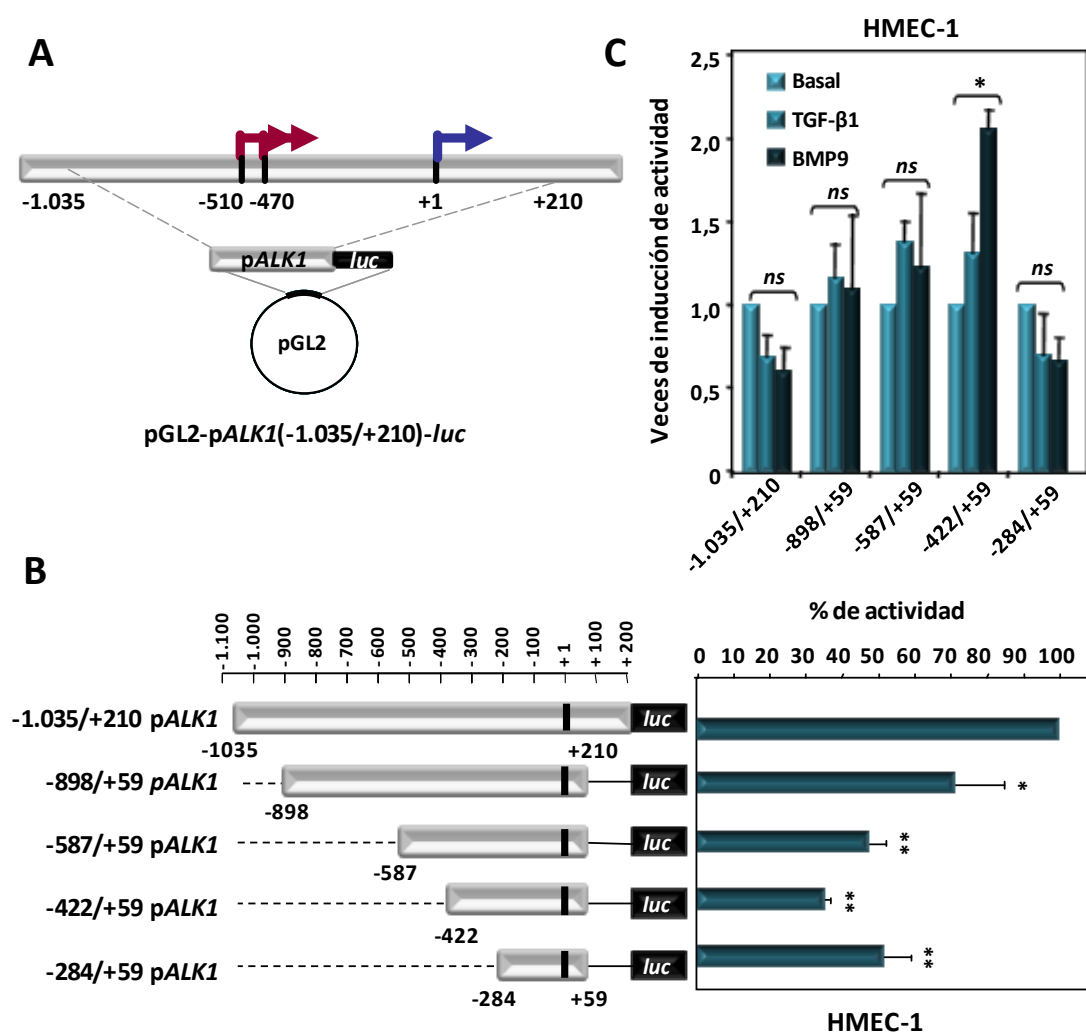
#### 1.4 La actividad transcripcional basal de delecciones seriadas del promotor de *ACVRL1* sugiere la presencia de regiones reguladoras positivas y negativas

Con el objeto de ensayar la actividad transcripcional de la región promotora de *ACVRL1*, la secuencia -1.035/+210 sometida a estudio se clonó en el vector reportero pGL2-basic-*luc*, carente de promotor propio, dando lugar a la construcción pGL2-pALK1(-1.035/+210)-*luc* (Figura 19A). Asimismo, se generaron cuatro fragmentos mediante sucesivas delecciones del extremo 5' de dicha secuencia promotora y se subclonaron en el mismo vector dando lugar a las construcciones: pGL2-pALK1(-898/+59)-*luc*, pGL2-pALK1(-587/+59)-*luc*, pGL2-pALK1(-422/+59)-*luc* y pGL2-pALK1(-284/+59)-*luc*.

A continuación, se ensayó la actividad transcripcional basal de cada secuencia en células endoteliales HMEC-1, observándose que la secuencia más pequeña (-284/+59) mantiene el 53% de la actividad de la secuencia -1.035/+210, y prácticamente la misma que la secuencia -898/+59 (67%). Por otra parte, la secuencia -422/+59 posee un 30% de la actividad de -1.035/+210 (Figura 19B). Esto indica que la transcripción basal depende fundamentalmente de la región cercana al sitio +1, subrayando su importancia. Estos resultados sugieren también que la zona alrededor de la posición -422 puede contener algún elemento represor. Un esquema de la región promotora clonada en pGL2-basic-*luc*, así como las actividades basales de las construcciones en HMEC-1 se muestra en la Figura 19.

Para comprobar si ALK1 está regulado transcripcionalmente por sus ligandos TGF- $\beta$ 1 y BMP9, células endoteliales HMEC-1 se transfectaron con las distintas construcciones del promotor de *ACVRL1* y posteriormente fueron tratadas con TGF- $\beta$ 1 y BMP9 a las dosis y tiempos establecidos en trabajos publicados anteriormente (Goumans y col., 2002). En estas condiciones, no se observó ningún efecto sobre la transcripción de ninguna de ellas, con la excepción de un ligero aumento de la actividad de la construcción -422/+59 en presencia de BMP9 (Figura 19C). Observaciones llevadas a cabo a lo largo del trabajo de esta tesis revelan que ALK1 aumenta su expresión en membrana tras tratamientos largos con TGF- $\beta$ 1, como se

verá más adelante, pero, a la vista de estos resultados, dicho aumento no se debería a un efecto transcripcional sobre las construcciones del promotor de *ACVRL1* ensayadas.



**Figura 19. Actividad transcripcional del promotor del gen *ACVRL1* humano.** **A.** Esquema del fragmento de promotor (-1.035/+210) clonado en el vector carente de promotor pGL2-basic-luc. Se muestran las posiciones de los tres inicios de transcripción. **B.** Esquema de las construcciones generadas mediante deleciones seriadas del extremo 5' de la secuencia del promotor de *ACVRL1* (izquierda) y actividad basal en células HMEC-1 (derecha). La eficiencia de transfección se corrigió con la actividad  $\beta$ -galactosidasa y se representa la actividad de cada fragmento como % respecto al 100% (otorgado a la actividad de la construcción -1.035/+210). **C.** Efecto de los ligandos de ALK1, TGF- $\beta$ 1 y BMP9, sobre la actividad promotora de las distintas construcciones. Las células HMEC-1 se transfectoron transitoriamente con las construcciones y después fueron tratadas con 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas o con 0,5 ng/ml de BMP9 durante 15 horas, según lo descrito en la bibliografía. No se observó ningún efecto transcripcional significativo de los ligandos sobre la expresión de ALK1, excepto un ligero aumento en la actividad de la construcción -422/+59 en presencia de BMP9 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns=no significativo).

## 1.5 Sp1 es un factor crítico para la transcripción basal de *ACVRL1*

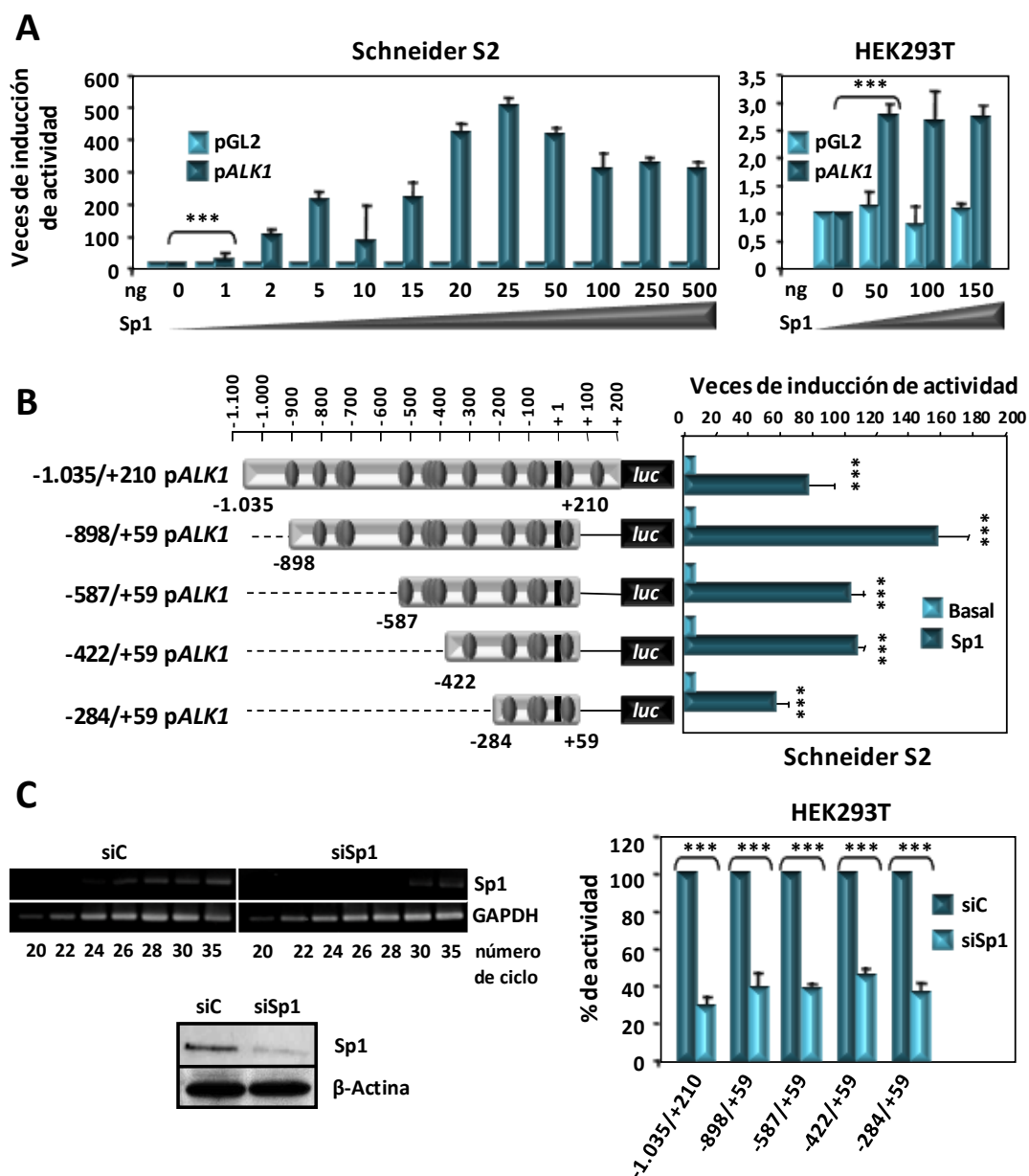
La contribución de los catorce sitios consenso de Sp1 hallados en el promotor de *ACVRL1* se evaluó en un entorno carente de expresión endógena de Sp1 como son las células

embrionarias Schneider S2 de *Drosophila melanogaster*. En este contexto de indiferenciación celular, donde ni Sp1 ni ninguno de los miembros de la superfamilia Sp están representados, los niveles basales de actividad del promotor son prácticamente indetectables. En cambio, la expresión ectópica de Sp1, mediante transfección del vector de expresión, mostró un efecto drástico sobre la transcripción del gen, incluso a concentraciones muy bajas. Asimismo, en un entorno celular en el que hay presencia de Sp1, como son las células humanas HEK293T, todas las construcciones presentaron una actividad transcripcional basal alta, y además conservaron el efecto inductor al sobreexpresar Sp1 exógeno, mostrando una cinética de dosis-respuesta en ambos casos. Se observa la saturación de los sitios Sp1 del promotor ante bajas concentraciones de Sp1 en el medio (25 ng pAc-Sp1/500  $\mu$ l/25.000 células en el caso de las Schneider S2 y 50 ng pCIneo-Sp1/500  $\mu$ l/25.000 células en el caso de las HEK293T), alcanzándose niveles de inducción de 500 veces en células Schneider S2, y de tres veces en el caso de las HEK293T. En ambos casos se llega a una meseta tras las mencionadas dosis a las que se obtuvo el efecto máximo. Ambos efectos se muestran en la Figura 20.

Así pues, Sp1 parece un factor de transcripción fundamental para conseguir el inicio de la transcripción en *ACVRL1*. Por tanto, se examinó el efecto de Sp1 también sobre las diferentes construcciones obtenidas por delección seriada en 5' de la secuencia promotora. Para ello, éstas se cotransfectaron con el vector de expresión de Sp1, a la concentración saturante (25 ng), en células Schneider S2. En concordancia con los datos anteriores, se observó una actividad basal prácticamente indetectable en todas las construcciones y una elevada inducción de la transcripción en presencia de Sp1. Es digno de mencionar que la capacidad de inducción de Sp1 sobre el promotor de *ACVRL1* consigue un efecto de la misma magnitud, tanto en la construcción completa (-1.035/+210), como en la construcción más pequeña (-284/+59). Este hecho sugiere que los sitios teóricos de unión a Sp1 hallados en las cercanías del sitio +1 son cruciales para el mecanismo de transcripción y posiblemente la respuesta de las construcciones a Sp1 se debe, en su mayor parte, a los sitios que se hallan en esta región. Todo ello se muestra en la Figura 20 (A y B).

Para constatar la importancia esencial de Sp1 en la transcripción de *ACVRL1*, se abolió la expresión de Sp1 en células de mamífero y se analizó la actividad transcripcional de las construcciones del promotor. Para ello, las células HEK293T se transfectaron con siARN (ARN de interferencia pequeño) dirigido específicamente hacia los transcritos de Sp1, y fueron posteriormente transfectadas con las delecciones seriadas del promotor. Tras lograr una disminución del 50% en la expresión de Sp1, la actividad de las construcciones del promotor de *ACVRL1* disminuyó a niveles del 30-40%. En la Figura 20C se muestran los niveles celulares de ARNm y proteína de Sp1 por RT-PCR y *western blot*, respectivamente, así como las actividades

transcripcionales de las construcciones (en porcentaje respecto a la actividad basal, 100%), tras el silenciamiento.

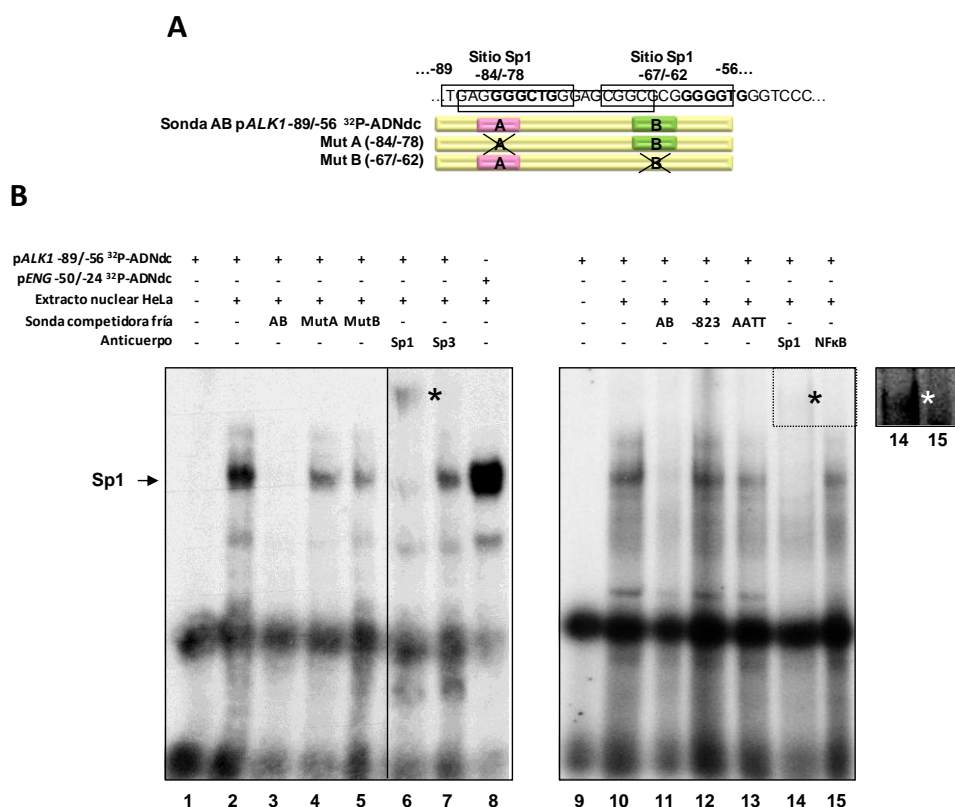


Resultados

**Figura 20. Efecto de Sp1 en la actividad del promotor de *ACVRL1*.** **A.** Efecto dosis-respuesta de la expresión de Sp1 en la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1* en células Schneider S2 y HEK293T. Las células S2 (carentes de expresión endógena de Sp1) y las células HEK293T se cotransfectaron con el vector pGL2 vacío o con la construcción pGL2-pALK1 (-1.035/+210) y con cantidades crecientes del vector de expresión de Sp1 (pAc-Sp1 y pCneo-Sp1 respectivamente). La actividad luciferasa se corrigió normalizando respecto a la actividad β-galactosidasa y se expresó en veces de inducción respecto a la actividad basal (en ausencia de Sp1). **B.** Izquierda, se muestra un esquema de la distribución de los sitios Sp1 a lo largo del promotor (óvalos grises) en las diferentes construcciones. Derecha, transfección transitoria de 25 ng de pAc-Sp1 en células S2 y actividad en cada una de las construcciones. **C.** Efecto del silenciamiento de Sp1 en la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1*. Las células HEK293T se transfectaron con siARN-Sp1 (siSp1) o con un siARN control (siC). A la izquierda se muestran niveles de ARNm y de proteína de Sp1 medidos por PCR semicuantitativa y western blot, respectivamente. A la derecha, 24 horas tras la transfección del siARN, se transfectaron las construcciones del promotor, y 24 horas después se midió la actividad luciferasa y se normalizó respecto a la actividad β-galactosidasa. Se muestra la actividad (en %) de cada construcción tras el silenciamiento de Sp1, respecto a la actividad basal (100%).

## 1.6 Caracterización de dos sitios Sp1 funcionales cercanos al inicio de transcripción de ACVRL1

Teniendo en cuenta que la región cercana al TSS +1 posee una elevada actividad transcripcional, se seleccionó el fragmento comprendido entre las posiciones -89/-56 para la síntesis de una sonda de doble cadena de ADN (ADNdc) que sirva para analizar su capacidad de unión a Sp1.



**Figura 21. Demostración de la existencia de dos sitios funcionales de unión a Sp1 en el promotor de ACVRL1. A.** Esquema del fragmento del promotor de ACVRL1 utilizado como sonda para los ensayos de movilidad electroforética retardada (EMSA), así como de las sondas mutadas utilizadas como competidores fríos. Se ensayaron dos sitios Sp1 situados en las cercanías del inicio de transcripción +1 (-84/-78 y -67/-62, llamados A y B respectivamente). **B.** Los EMSAs se realizaron con la sonda que conserva la secuencia natural del promotor (llamada AB) marcada con <sup>32</sup>P. Las sondas frías utilizadas para las competiciones fueron: MutA (mutando el sitio Sp1 -84/-78); MutB (mutando el sitio Sp1 -67/-62); y dos secuencias irrelevantes, la región -823/-795 del promotor de ACVRL1 (llamada -823), que no posee sitios teóricos de unión a Sp1, y una sonda compuesta por adeninas y timinas (denominada AATT). Un control positivo de unión de Sp1 fue la sonda del promotor de ENG (-50/-24) incluida en el carril 8 (explicación en la sección “Materiales y Métodos”). La banda de retardo de Sp1 se señala con una flecha. Los asteriscos indican el super-retardo (*supershift*) provocado por la adición de anticuerpo. La pequeña ventana situada a la derecha de la figura muestra una sobreexposición de la película para evidenciar el *supershift* del carril 14. Como controles negativos se emplearon anticuerpos anti-Sp3 y anti-NFκB.

Dicho fragmento posee dos sitios de reconocimiento teórico por Sp1 situados en -84/-78 y en -67/-62, respectivamente. La sonda de ADNdc generada se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P-γATP en sus extremos 5' y fue utilizada en ensayos de movilidad electroforética retardada



(EMSA) junto con extractos nucleares de células HeLa (con abundante expresión de Sp1) para detectar la posible unión de Sp1 a la sonda. Como resultado, se obtuvo una banda de retardo debida al reconocimiento de la sonda por la proteína Sp1 presente en el lisado nuclear de HeLa. La especificidad de la unión se demostró compitiendo con un exceso de sonda fría (que compitió totalmente la unión), y de sonda mutada, bien en el sitio -84/-78 o en el sitio -67/-62. En estos dos casos se obtuvo una competición parcial, pero no se anuló la unión, demostrando la funcionalidad de ambos sitios. Por otra parte, se utilizaron otras dos sondas frías competidoras no relacionadas con la sonda problema: una secuencia artificial compuesta de adeninas y timinas (AATT), y una secuencia del pALK1 que no presenta ningún sitio teórico de unión de Sp1 (-823). Además, se demostró que el retraso estaba producido por la unión de Sp1 y no de otra proteína mediante la incubación en paralelo de la reacción de unión (del lisado nuclear con la sonda) con anticuerpo anti-Sp1. Se obtuvo una banda de super-retardo o *supershift* debido al reconocimiento de Sp1 unido al ADNdc por el anticuerpo, formando un complejo de mayor peso molecular. Como control del *supershift* se usaron anti-Sp3 y anti-NFkB, anticuerpos con los que no se obtuvo banda de super-retardo. Estos resultados, que se muestran en la Figura 21, demuestran que ambos consensos Sp1 -84/-78 y -67/-62 son funcionales y se unen a Sp1 *in vitro*.

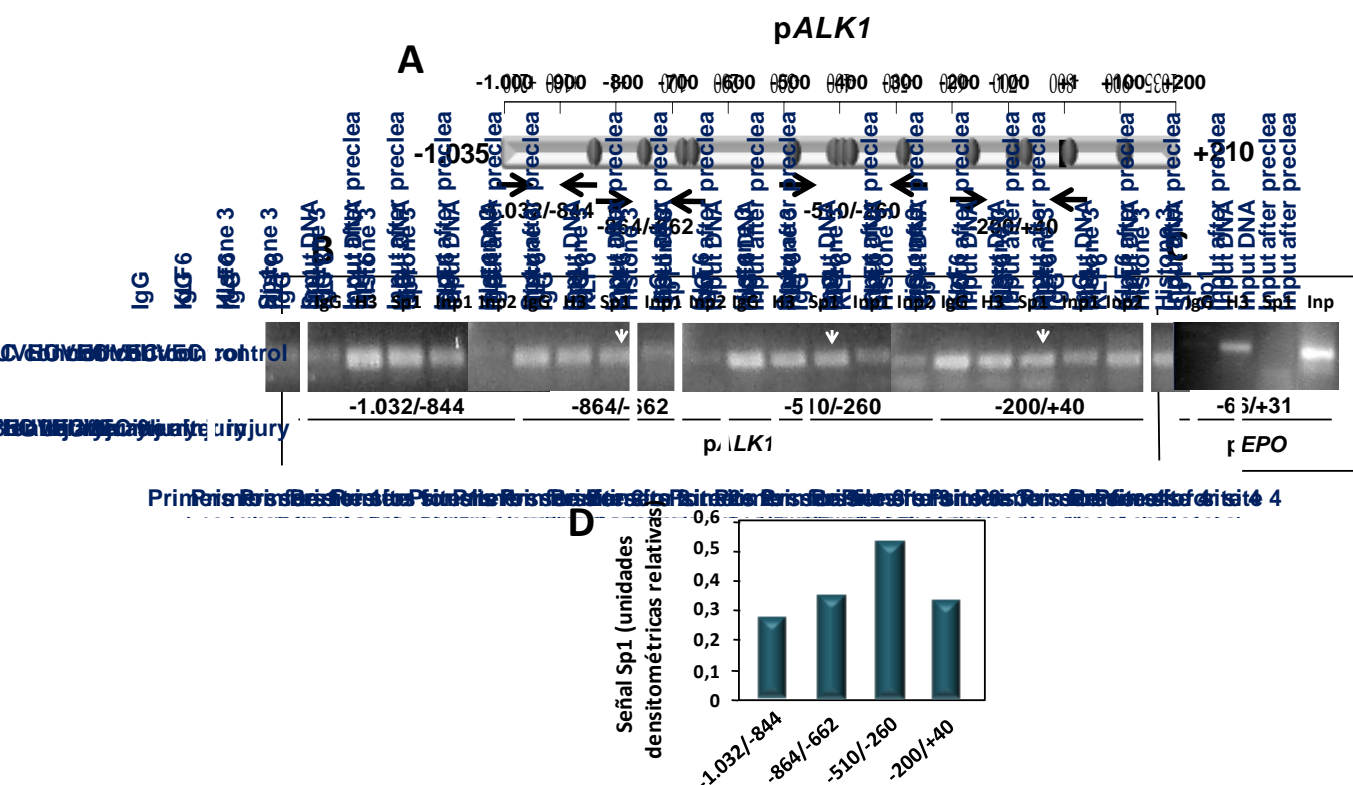
Resultados

### 1.7 Sp1 se une *in vivo* al promotor de ACVRL1 en células endoteliales

Los resultados anteriores indican que Sp1 es capaz de reconocer *in vitro* las secuencias consenso -84/-78 y -67/-62 situadas cerca del TSS +1 del promotor de ACVRL1. Sin embargo, es esencial estudiar si, en las condiciones celulares, Sp1 se une efectivamente al promotor *in vivo*. Para estudiar la posible unión de Sp1 endógeno al promotor de ACVRL1 en células endoteliales se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células HUVEC. Se entrecruzó la cromatina de las células en cultivo mediante fijación, con la finalidad de mantener unidas al ADN genómico a las proteínas que en ese momento estuvieran interaccionando con él. Después, se procedió a la inmunoprecipitación del ADN unido a Sp1 con anticuerpos anti-Sp1. Tras ello, se digirió la cromatina con una mezcla enzimática, optimizando el tiempo de reacción hasta obtener fragmentos de unos 200 pb. Para la amplificación y detección de las secuencias de ADN unidas a Sp1 e inmunoprecipitadas, se diseñaron cuatro parejas de cebadores que dividen la secuencia -1.035/+210 del promotor de ACVRL1 en cuatro regiones. Esas regiones son: -1.032/-844, -864/-662, -510/-260 y -200/+40. Como control negativo de unión, se amplificó en paralelo una región del promotor del gen de



eritropoyetina (*EPO*). En trabajos anteriores de nuestro grupo habíamos demostrado que Sp1 no se une al promotor de *EPO* en dicha región sin la presencia de otro estímulo adicional, que es el estímulo hipóxico (Sanchez-Elsner y col., 2004). Como resultado, se detectó unión de Sp1 a lo largo de los cuatro fragmentos del promotor de *ACVRL1* analizados, en HUVECs. Podemos concluir a la vista de estos resultados que la mayoría de los sitios de unión a Sp1 presentes en el promotor de *ALK1* son funcionales en dicho tipo celular (Figura 22).



**Figura 22. Demostración de la existencia de unión de Sp1 endógeno al promotor de ACVRL1 en células endoteliales HUVEC.** **A.** El esquema muestra los cebadores utilizados para los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), abarcando toda la secuencia comprendida entre las posiciones -1.035/+210 del promotor de ACVRL1. Cada pareja de cebadores amplifica una región de 200-250 pb. **B.** ChIP de Sp1 en el promotor de ACVRL1 en HUVECs. La cromatina fue digerida obteniendo un enriquecimiento en fragmentos de tamaño 100-300 pb antes de ser sometida al ChIP. Anticuerpo anti-Histona 3 y una mezcla de IgGs de conejo fueron utilizados como controles positivo y negativo de la inmunoprecipitación, respectivamente. El ADN procedente del lisado nuclear (*input*) fue cargado en el gel, tanto directamente (*Inp1*), como tras un proceso de preaclorado (*Inp2*). **C.** Como control negativo del ChIP de Sp1 se utilizó un fragmento del promotor de eritropoyetina (pEPO) (Sánchez-Elsner y col., 2004). **D.** La unión de Sp1 a las distintas regiones del promotor de ACVRL1 se cuantificó mediante densitometría de las bandas procedentes del ChIP. Se representan las relaciones (Sp1-IgG)/Inp2 en cada segmento.

### 1.8 El estado de metilación de las islas CpG en el promotor del gen *ACVRL1* modula la expresión de ALK1 en células endoteliales

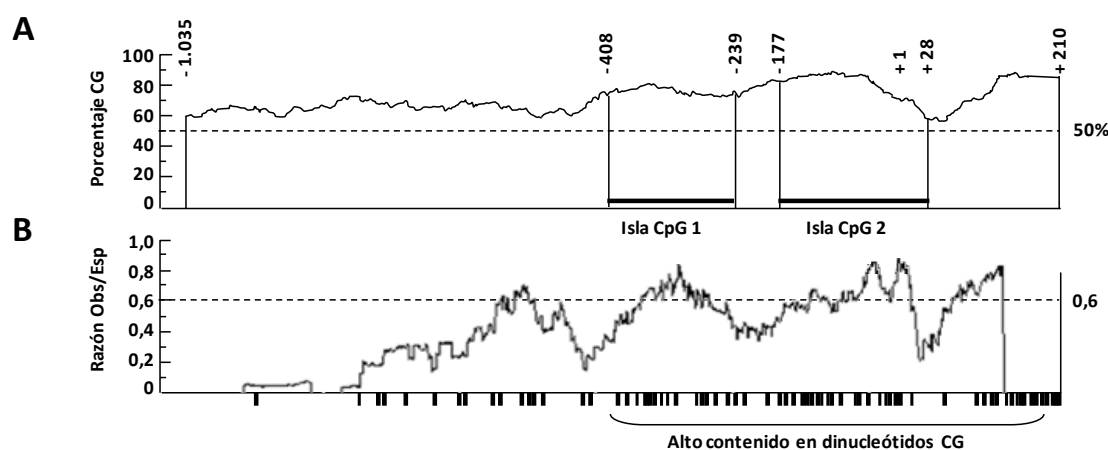
El análisis *in silico* efectuado con el programa MatInspector reveló una elevada frecuencia de residuos G y C a lo largo de la secuencia -1.035/+210 del promotor de *ACVRL1*. El hecho de

que el promotor carezca de cajas generales de transcripción y que su actividad transcripcional basal esté dirigida por la cooperación de Sp1 con la maquinaria transcripcional basal hace que el estado en que se encuentran esas regiones de unión a Sp1 cobre importancia como objeto de estudio. Normalmente, estas secuencias pueden estar afectadas por alguna modificación epigenética como es la metilación de citosinas por metilasas de ADN de la célula. La metilación suele producirse en las llamadas “islas CpG”, de tal modo que la presencia en el promotor de estas islas sugeriría la posibilidad de regulación transcripcional a este nivel.

Para la detección de las “islas CpG” se utilizó el programa CpGPlot, que utiliza ciertos parámetros para seleccionar las áreas ricas en G y C que se pueden considerar “islas”. Los criterios son: 1) Un porcentaje total en nucleótidos G+C superior al 50%, y 2) Una relación entre parejas 5'-CG-3' reales respecto del contenido total G+C superior al 0,6 (en una escala del 0 al 1). Este hecho se debe a que sólo las citosinas situadas en el extremo 5' de una guanina son utilizadas como sustrato de la metilación por las ADN metilasas.

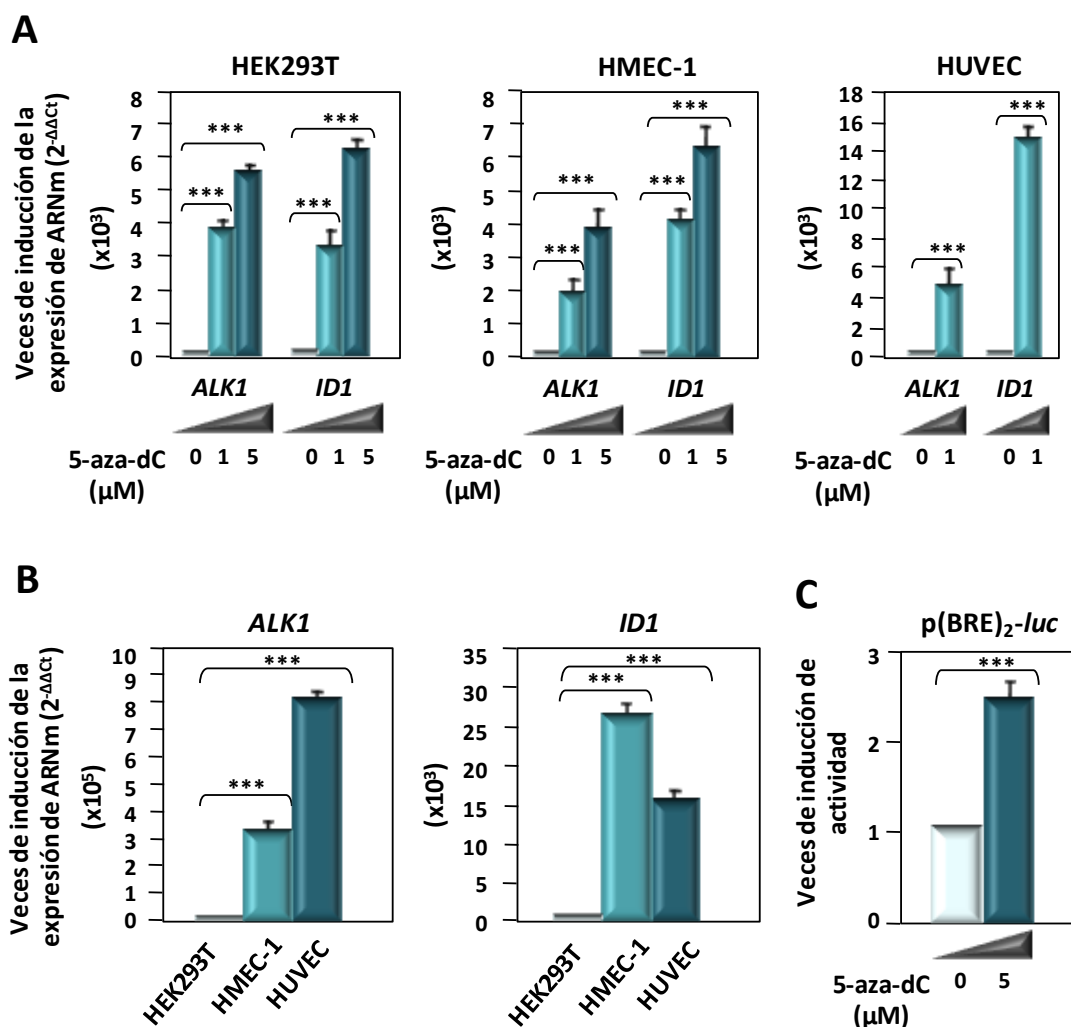
Basado en este análisis predictivo se hallaron dos grandes “islas CpG” a lo largo del promotor, localizadas en las regiones -408/-239 y -177/+28. Ambas islas se localizan en los alrededores, tanto del inicio de transcripción +1, como de los dos nuevos inicios de transcripción descritos en este trabajo (-470 y -510), lo cual hace centrar el interés sobre la posible regulación relacionada con la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1*. Las gráficas representativas de la presencia de ambas islas GpC se muestran en la Figura 23.

Resultados



**Figura 23. El promotor de *ACVRL1* posee dos islas CpG.** A. Representación esquemática de la presencia de residuos C (citocina) y G (guanina) en la región -1.035/+210 del promotor de *ACVRL1*. El contenido en G+C se muestra como porcentaje de residuos G+C respecto al total de residuos de la región, calculado con la herramienta informática CpGplot. B. Presencia de dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados en el promotor de *ACVRL1*. Se considera que hay dinucleótidos susceptibles de ser metilados en una región cuando la relación entre los residuos CG reales (observados) entre el total de esperados (que se calcula según el porcentaje de residuos G+C indicado anteriormente) es superior a 0,6 (en una escala del 0 al 1). Las islas CpG se sitúan en áreas cuyo porcentaje de C+G es > 50% y la razón Obs/Esp es > 0,6. Según estos parámetros, se localizan dos islas CpG (-408/-239 y -177/+28) en las cercanías de los inicios de transcripción: +1, -470 y -510.

Para estudiar el efecto de la metilación de ADN sobre la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1*, células endoteliales HMEC-1 y HUVEC fueron sometidas a un procedimiento de desmetilación de ADN *in vitro* mediante tratamiento con el agente 5'-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) durante 7 días (Figura 24A). El número de transcritos de *ALK1* en ambos tipos celulares se estudió por PCR en tiempo real. Tras el tratamiento desmetilante durante 7 días, el número de moléculas de ARNm de *ALK1* aumentó entre 7.000-14.000 veces.



Resultados

**Figura 24.** El tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) aumenta la expresión de *ALK1* en células endoteliales. **A.** Las gráficas muestran los niveles de ARNm de *ALK1* e *ID1* en células endoteliales HUVEC y HMEC-1 y en células epiteliales HEK293T antes y después del tratamiento con 5-aza-dC. Los niveles de *ID1* se midieron como gen diana de la ruta de señalización mediada por TGF- $\beta$ /ALK1. Las células se trataron con 5-aza-dC a concentración 1  $\mu$ M o 5  $\mu$ M durante una semana. El tratamiento a dosis 5  $\mu$ M resultó tóxico en cultivos primarios de HUVEC. Los resultados de la PCR en tiempo real se muestran como factor de inducción respecto a la expresión basal ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). **B.** Las gráficas muestran los niveles basales de *ALK1* e *ID1* en los tres tipos celulares. Las células HEK293T en situación basal no expresan ninguno de los dos transcritos, mientras que ambos tipos de células endoteliales expresan altos niveles de *ALK1* e *ID1*. **C.** La gráfica muestra el efecto del agente desmetilante 5-aza-dC sobre el reportero p(BRE)<sub>2</sub>-luc, específico de la ruta de señalización de TGF- $\beta$ /ALK1, en células HMEC-1. Los resultados se muestran en veces de inducción de la actividad luciferasa, corregida previamente respecto a la actividad  $\beta$ -galactosidasa. (\*\*\*)  $p < 0,005$ .

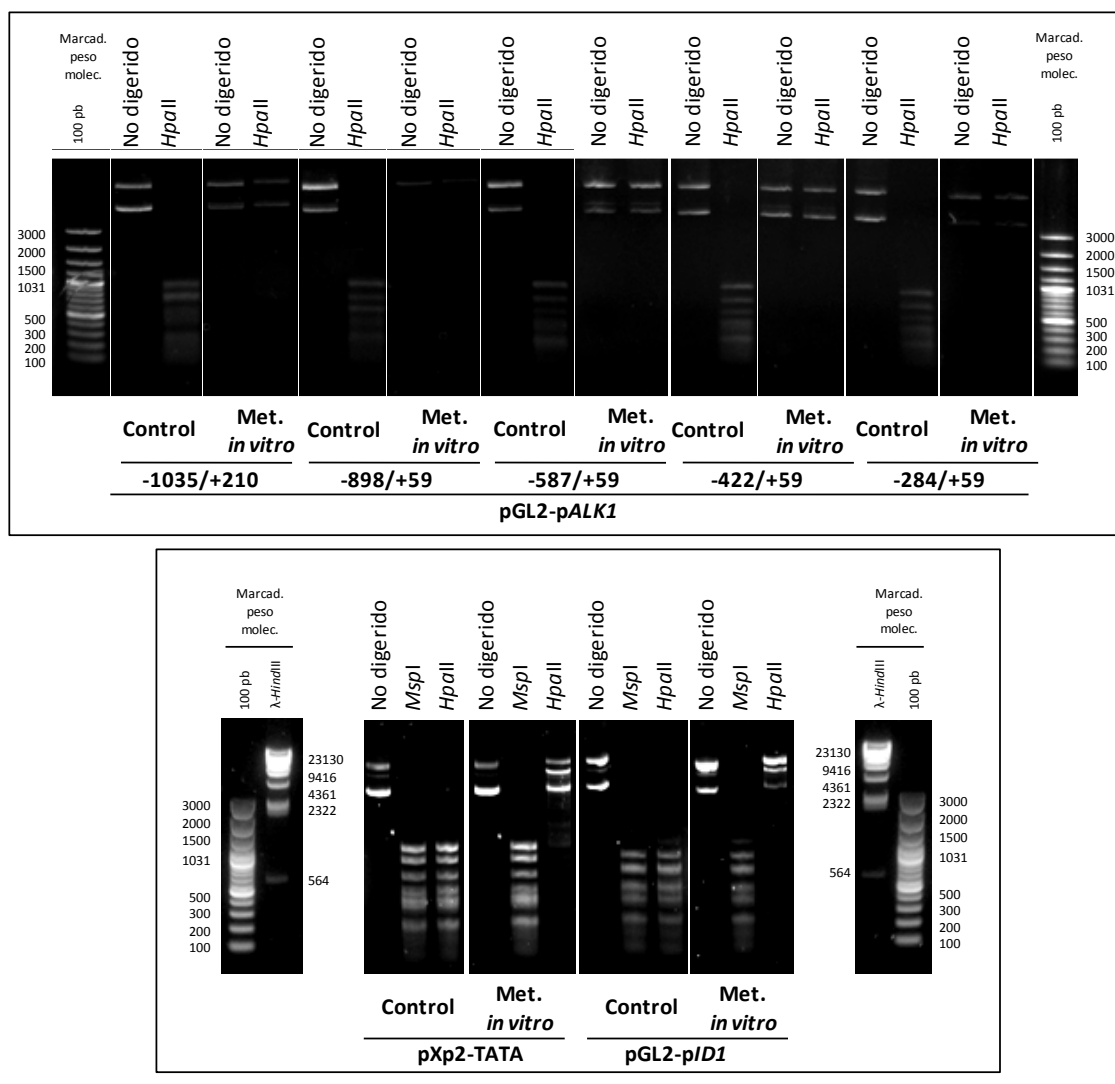
Curiosamente, células que normalmente no expresan ALK1 como son las epiteliales embrionarias HEK293T sufrieron una activación de magnitud similar al ser activada la transcripción del gen por tratamiento con el agente desmetilante, si bien la expresión endógena de ALK1 por dichas células es indetectable (Figura 24B).

Se estudió la expresión del gen *ID1*, diana génica de la cascada de señalización TGF- $\beta$ 1/ALK1, que resultó inducida tras el tratamiento, lo cual sugiere la posible activación funcional de la ruta en paralelo a ese aumento en la expresión de ALK1 (Figura 24, A y B). Una manera de comprobar si la actividad de la ruta aumentó tras la desmetilación del promotor de *ACVRL1* fue evaluar la actividad del reportero específico de la ruta de TGF- $\beta$ /ALK1, el vector p(BRE)<sub>2</sub>-*luc*. Efectivamente, tras la desmetilación producida con la 5-aza-dC, la actividad reportera del vector p(BRE)<sub>2</sub>-*luc* era unas 2,5 veces mayor (Figura 24C).

Una vez demostrados los efectos de la desmetilación global del ADN genómico a largo plazo en la expresión de ALK1 y su diana *ID1*, teniendo en cuenta que la activación de la ruta podría deberse no sólo a la desmetilación del promotor de *ACVRL1*, sino también a la de promotores de otros miembros de la ruta de señalización, se evaluó el efecto directo de la metilación sobre la actividad del promotor de *ACVRL1*. Para ello, se hicieron experimentos de metilación *in vitro* sobre las construcciones reporteras. Tanto el promotor como las delecciones seriadas fueron sometidos a metilación *in vitro* con la metilasa M.SssI en presencia y ausencia del sustrato S-adenosil-metionina (SAM) y se evaluaron sus actividades transcripcionales. La efectividad de la metilación se comprobó mediante un análisis de restricción con las enzimas *MspI* y *HpaII*, cuya diana es en ambos casos 5'-CCGG-3', pero su metilación en la segunda citosina evita el reconocimiento por *HpaII*, mientras que sigue siendo reconocible por *MspI*. De este modo el patrón de restricción con ambas enzimas antes y después del tratamiento aseguró el correcto funcionamiento del experimento (Figura 25).

A continuación, se transfectaron células HEK293T con las construcciones del promotor de *ACVRL1* metiladas y sin metilar (con la enzima pero sin SAM) y se evaluó su actividad, resultando en una completa abolición de la actividad de todas ellas, como se observa en la Figura 26. Este resultado demostró que el estado de metilación del promotor modula fuertemente la expresión de ALK1. Por el contrario, el efecto de la hipermetilación *in vitro* no tuvo ningún efecto sobre la actividad del promotor mínimo del gen de prolactina (conteniendo caja TATA) insertado en el vector reportero pXp2. Para descartar que el efecto transcripcional de *ID1* también se estuviera viendo afectado por fenómenos de metilación/desmetilación, se hizo el mismo experimento en paralelo con el vector reportero que contiene su promotor (pGL2-p/*ID1*). De este modo se observó que, si bien sus niveles de actividad disminuían, no lo hacían de un modo tan drástico como en el caso de *ACVRL1*, resultando en una disminución

del 11% frente al 2% de *ACVRL1* en células HEK293T, y lo que es más importante, resultando en una disminución del 29% frente al 9% de *ACVRL1* en un contexto celular natural, las células endoteliales HMEC-1.

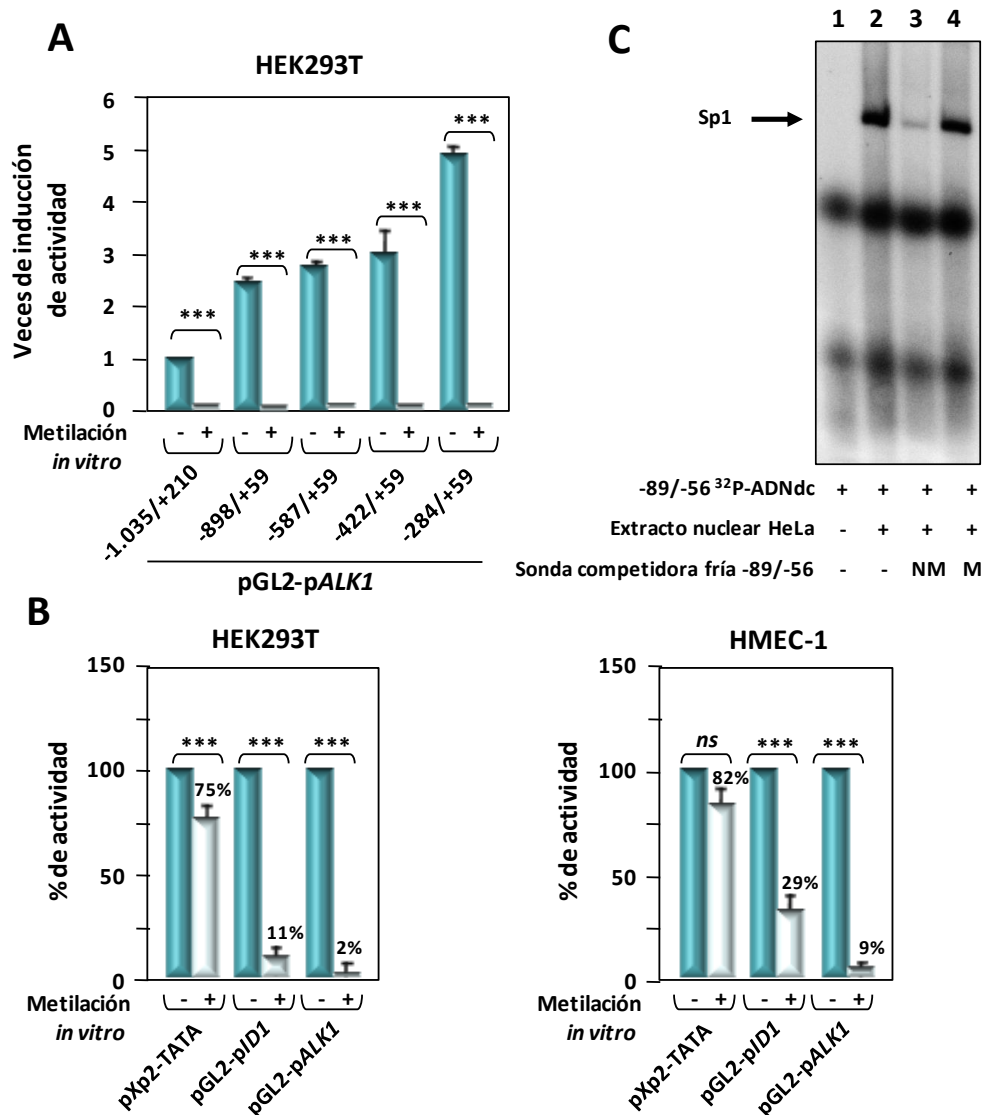


## Resultados

**Figura 25. Digestión de las construcciones pGL2-pALK1, pXp2-TATA y pGL2-p/D1 con las enzimas de restricción *MspI* y *HpaII*, tras la metilación *in vitro* con *M.SssI*, para comprobar la efectividad del proceso.** La efectividad de la metilación *in vitro* llevada a cabo con la metilasa *M.SssI* sobre las distintas construcciones se comprobó mediante un análisis de restricción en paralelo con las enzimas *MspI* y *HpaII*. En ambos casos, la diana es 5'-CCGG-3', pero la metilación en la segunda citosina evita su reconocimiento por *HpaII*, mientras que sigue siendo reconocible por *MspI*. De este modo, el patrón de restricción con ambas enzimas antes y después del tratamiento cambia. Esta comprobación es necesaria para asegurar las condiciones en las que se encuentran las construcciones previamente al ensayo de su actividad por transfección en el cultivo celular.

Para estudiar si el estado de metilación de los sitios Sp1 afectaba a la unión de Sp1, la unión de Sp1 a la sonda pALK1 -89/-56 (que posee los dos sitios Sp1 funcionales) marcada radioactivamente se compitió con dos sondas frías correspondientes a la misma secuencia tanto sin metilar como metilada *in vitro*. De este modo se comprobó que la sonda fría metilada era totalmente incapaz de competir la unión a Sp1 de la sonda marcada, mientras que la sonda

fría sin metilar competía totalmente la unión. Esto demuestra que el estado de metilación de los sitios Sp1 dentro del promotor de *ACVRL1* es crucial para la capacidad de reconocimiento por dicho factor, disminuyendo la unión cuanto mayor es el estado de metilación, y por tanto es un evento crítico en la modulación de la actividad transcripcional del promotor mediada por Sp1. Todos los resultados mencionados se muestran en la Figura 26.



Resultados

**Figura 26. Efecto de la metilación *in vitro* sobre la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1*.** A. Tratamiento con la metilasa M.SssI sobre las distintas construcciones del promotor de *ACVRL1*, en presencia y en ausencia del sustrato S-adenosil-metionina. Tras la metilación *in vitro*, las construcciones fueron transfectadas en células HEK293T y se midió su actividad transcripcional referida a  $\beta$ -galactosidasa. B. Efecto de la metilación *in vitro* sobre otros promotores: pXp2-TATA (vector reportero conteniendo el promotor mínimo -caja TATA- del promotor de prolactina de rata); promotor de *ID1* y promotor de *ACVRL1/ALK1*, tanto en células HEK293T (izquierda) como en células HMEC-1 (derecha). C. Ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA) efectuado con la sonda de la región -89/-56 del pALK1 (conteniendo los dos sitios Sp1 funcionales) marcada radiativamente, y su competición con la misma secuencia sin marcar, tanto no metilada (NM) como metilada *in vitro* (M) (\*\* $p < 0,005$ ; ns = no significativo).

## 2 Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al daño endotelial

### 2.1 Alk1 aumenta su expresión en el endotelio durante el proceso de remodelación vascular en un modelo de ratón

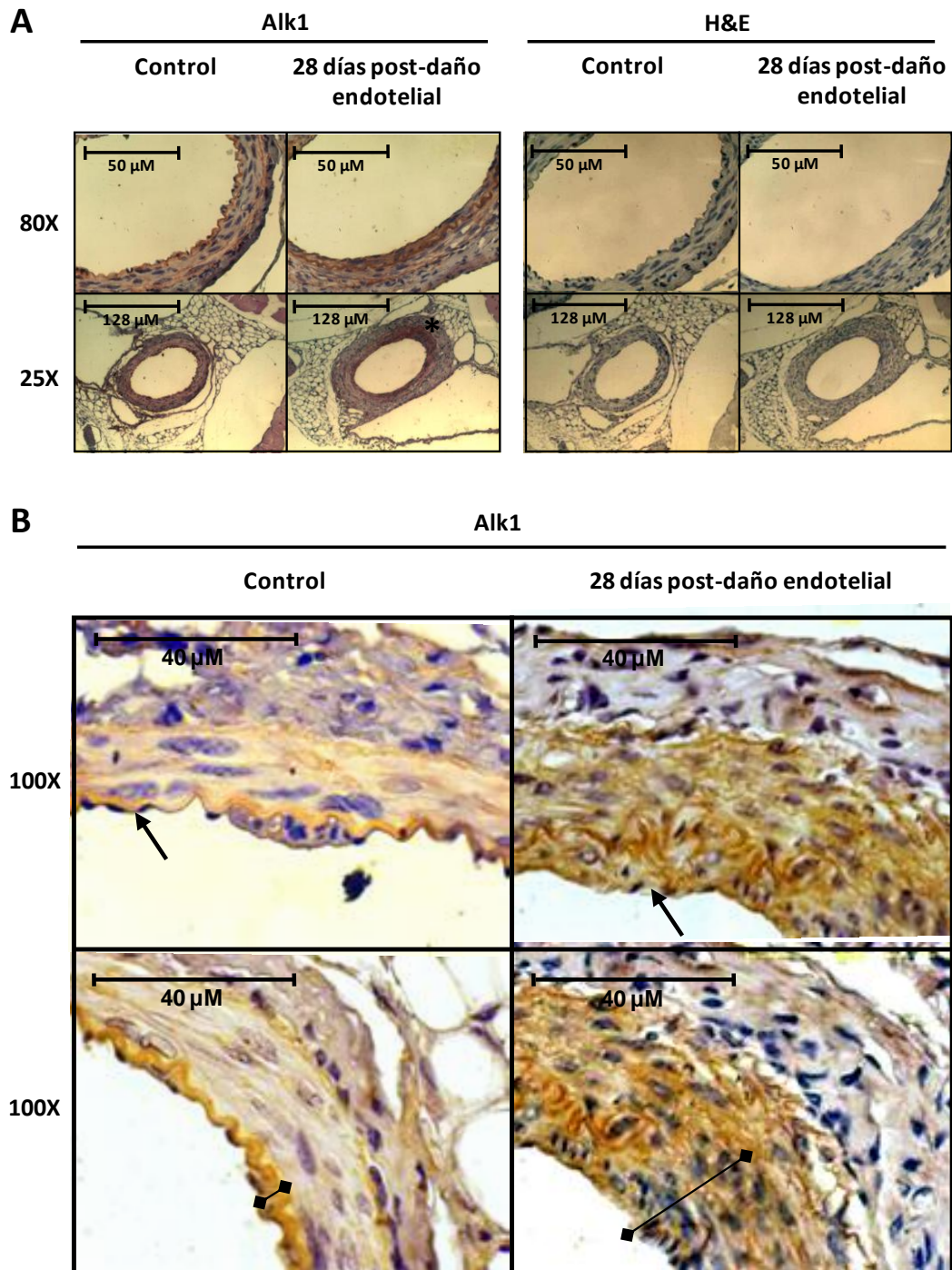
Para analizar la expresión de ALK1 durante procesos de reparación vascular, elegimos un modelo de daño vascular *in vivo* efectuado en arteria femoral de ratón. En este modelo, los ratones anestesiados son sometidos a daño vascular en la arteria femoral de una extremidad utilizando para ello un alambre guía de angioplastia. El alambre se introduce tres veces por la arteria femoral, dañando la túnica íntima endotelial, que se desprende. Después, se deja regenerar el tejido durante 28 días y se sacrifica el ratón. El tejido de interés se extrae (tanto la arteria femoral procedente del daño como la de la extremidad contraria, que se usa como control no dañado) y se incluye en parafina. Publicaciones anteriores demuestran que la proliferación de la capa neoíntima se aprecia 4 semanas después del daño. Esta nueva capa es una capa engrosada de túnica íntima que se forma en situaciones patológicas, tal como ocurre tras aterosclerosis o daño endotelial (vasculopatías autoinmunes, restenosis tras angioplastias etc.) y se origina por la proliferación de células de la capa media y el reclutamiento de nuevas células endoteliales procedentes de precursores circulantes por el torrente sanguíneo. Dicha capa neoíntima es visible desde la lámina elástica interna hacia la luz vascular y su composición es rica en tejido conectivo, proteínas de matriz extracelular, células musculares lisas y células endoteliales. En este modelo se analizó la presencia de Alk1, detectándose un aumento claro de su expresión a lo largo de toda la capa fibrocelular de la neoíntima, sugiriendo su posible papel en la proliferación de las células endoteliales durante el proceso de remodelación vascular tras daño agudo.

Resultados

(Página siguiente)

**Figura 27. La expresión de Alk1 aumenta notablemente en la capa neoíntima proliferativa de arterias femorales de ratón sometidas a daño mecánico. A.** En la figura se observan secciones transversales de arteria femoral murina tras 28 días de daño transluminal de la capa interna efectuado con un alambre guía de angioplastia de 0,25 mm de diámetro. También se muestran las arterias femorales sin someter a daño de la extremidad opuesta, como control. Aparece una hiperplasia de la túnica íntima como consecuencia del daño, y esto va asociado a altos niveles de expresión de Alk1. Se emplearon 5 ratones para el experimento y se muestra una fotografía representativa de cada caso. Los aumentos mostrados en las fotografías corresponden a 25X y 80X. Se muestran tinciones de hematoxilina-eosina (H&E) en paralelo a las tinciones de Alk1 para observar la estructura vascular y añadiendo un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo como control de especificidad. El asterisco indica la zona de mayor expresión de Alk1 del vaso dañado respecto al vaso control. **B.** Detalle de la capa íntima (de la arteria femoral control) y neoíntima (de la arteria femoral dañada, tras 28 días) a 100 aumentos donde se aprecia la diferencia de grosor, estructura y tinción de Alk1 entre ambas condiciones. Las flechas señalan las células endoteliales. La capa ondulada corresponde a la elástica interna arterial, donde comienza la capa neoíntima, cuyo grosor se señala con el símbolo ◆◆.





Resultados

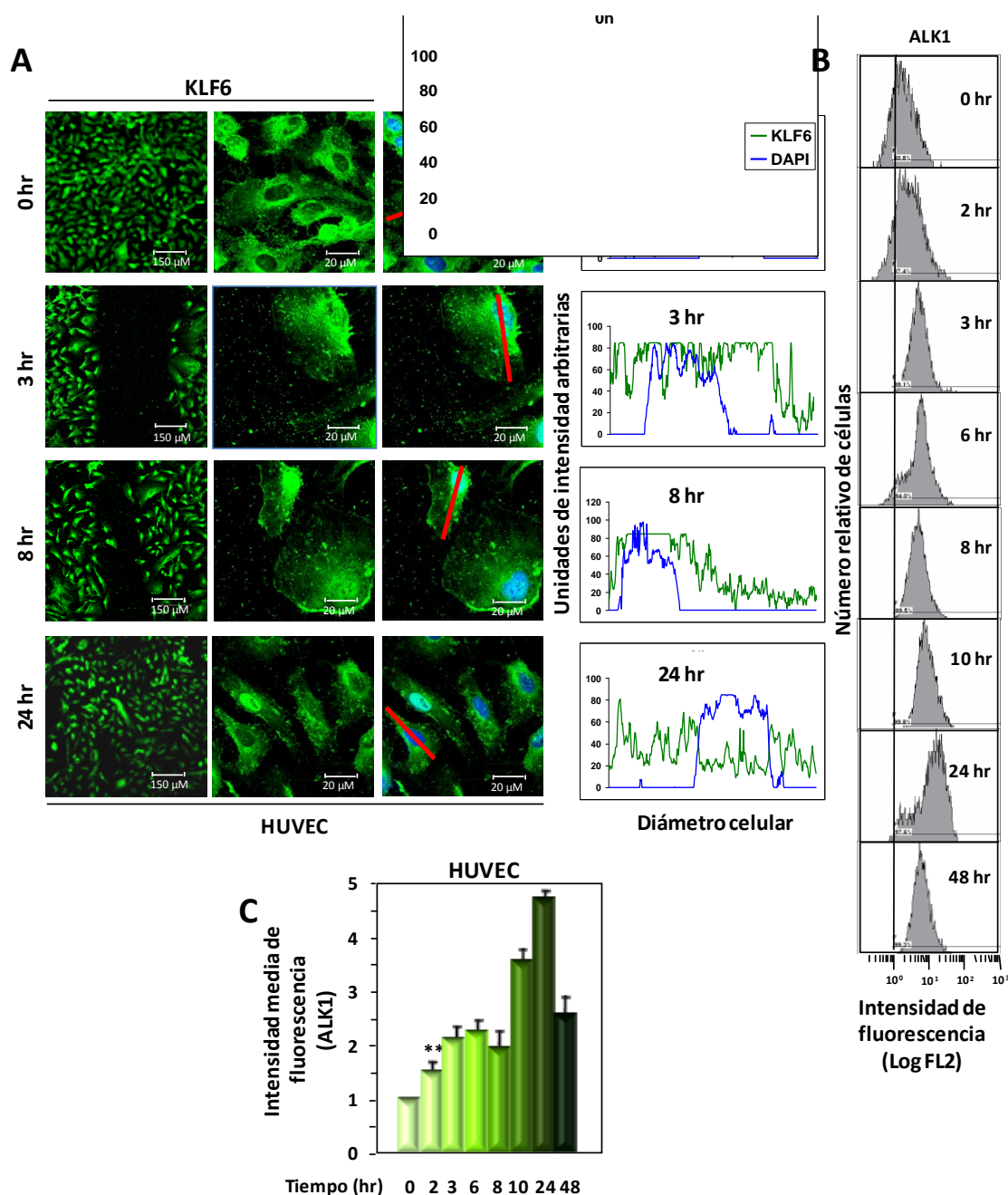
## 2.2 ALK1 aumenta su expresión en células endoteliales dañadas *in vitro*, tras la translocación de KLF6 al núcleo

Ante una situación de daño endotelial, el principal factor de respuesta transcripcional que se moviliza es KLF6, translocándose rápidamente al interior del núcleo donde regula sus genes diana. Para estudiar la movilización de KLF6 tras el daño al endotelio establecimos un modelo



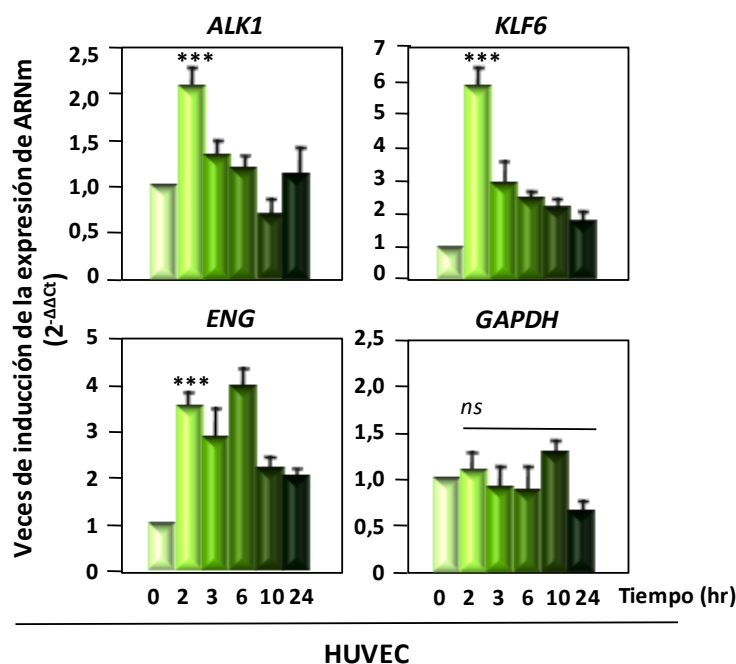
de daño *in vitro* en el que monocapas de células endoteliales en cultivo primario HUVEC son dañadas con una punta de pipeta y se analiza el cierre de la herida a distintos tiempos. Siguiendo este protocolo, se estudió la translocación de KLF6 al núcleo mediante inmunofluorescencia y, en paralelo, se analizaron los patrones de expresión de ALK1 por citometría de flujo, inmunofluorescencia y RT-PCR en tiempo real. Como resultado de la tinción de KLF6, se observó una cinética de translocación muy rápida. En situación basal, se aprecia la distribución citosólica de KLF6, no observándose ninguna señal en el núcleo. Sin embargo, a las 3 horas tras el daño de la monocapa, KLF6 está distribuido tanto en el compartimento citosólico como en el nuclear. La translocación al núcleo es total pasadas 8 horas, cuando comienza el proceso de remodelación vascular y las células están proliferando y migrando para cerrar la herida. A las 24 horas, la situación vuelve a ser idéntica a la basal, con la herida cerrada y KLF6 redistribuido de nuevo por el citosol (Figura 28A). Durante este tiempo, KLF6 ha actuado sobre sus genes diana, los cuales han podido ser regulados, bien por activación o por represión.

El patrón de distribución de ALK1 en la membrana de la célula endotelial se estudió por inmunofluorescencia, no observándose diferencias significativas (datos no mostrados). Esta técnica permite detectar cambios en la distribución y localización celular pero tiene una capacidad limitada de cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Aunque el patrón de distribución de ALK1, obtenido por inmunofluorescencia, no varía durante el cierre de la herida, mediante citometría de flujo se observó un aumento de hasta 5 veces en los niveles de expresión de ALK1 en la membrana de células HUVEC a las 24 horas tras el daño endotelial (se efectuaron múltiples heridas para obtener el mayor número posible de células dañadas). El aumento comienza a ser patente desde las 2-3 horas, alcanzando el máximo mencionado a las 24 horas y comenzando a retornar a niveles basales a las 48 horas (Figura 28, B y C). Esta relación temporal entre las cinéticas de translocación de KLF6 y de sobreexpresión de ALK1 es compatible con una regulación de la expresión a nivel transcripcional, es decir, el aumento de ALK1 muestra unas horas de retraso respecto a la translocación nuclear del factor de transcripción. Para corroborar esta hipótesis, se midieron los niveles de ARNm de *ALK1* en dichos cultivos a distintos tiempos tras el daño, observándose un aumento de dos veces en el número de transcritos de *ALK1* a las 2 horas. El mismo aumento mostraron los transcritos de *KLF6* y de endoglina (*ENG*), gen diana de KLF6. Se demuestra así que KLF6, además de translocarse a núcleo, es capaz de aumentar su expresión transcripcional durante el proceso de remodelación. Como control negativo, los niveles de *GAPDH* no varían en respuesta al daño (Figura 29).



Resultados

**Figura 28. La expresión de ALK1 aumenta en la membrana de células endoteliales HUVEC sometidas a un modelo de daño *in vitro*.** **A.** Los cultivos primarios de células HUVEC fueron sometidos a daño *in vitro* mediante la realización de una herida sobre la placa de cultivo. Se estudió la localización intracelular de KLF6 por inmunofluorescencia a lo largo del tiempo. Se muestra la localización de KLF6 (fluorescencia verde) respecto al núcleo (DAPI-azul) en las fotografías a distintos tiempos (0 horas, 3 horas, 8 horas y 24 horas) y al lado se representa un histograma de la distribución de ambas señales en la sección longitudinal de una célula representativa de cada fotografía (indicada con una línea roja). En la situación basal (0 horas), KLF6 está distribuido por el citoplasma y no se detecta en el núcleo. A las 8 horas, KLF6 está completamente translocado a núcleo, donde colocaliza con la señal del DAPI, y a las 24 horas vuelve a la distribución inicial. **B y C.** En paralelo se midieron los niveles de ALK1 en la membrana de dichas células por citometría de flujo. La expresión de ALK1 aumenta desde las 2 horas tras el daño y este aumento es máximo a las 12-24 horas (entre 4-5 veces), de modo concordante con la hipótesis de su regulación transcripcional. Se muestran en la gráfica los niveles de fluorescencia media procedentes del marcaje de ALK1 en citometría de flujo. (\*\* $p < 0,01$ ).



**Figura 29.** Los niveles de transcritos de *ALK1* aumentan tras el daño endotelial *in vitro*. Análisis cuantitativo efectuado por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de *ALK1* en células HUVEC a distintos tiempos tras someter el cultivo a daño *in vitro*. Se muestran también los niveles de ARNm de *KLF6*, *ENG* y *GAPDH*. Los niveles de ARNm de *KLF6* y *ENG* también aumentan. *ENG* se utilizó como control positivo, ya que es un gen diana de *KLF6* tras daño. *GAPDH* se utilizó como control negativo, ya que sus niveles no cambian. A las 2 horas tras el daño, los niveles de *KLF6* aumentan 6 veces, y los niveles de *ALK1* aumentan al doble, retornando después progresivamente a los niveles basales. (\*\*\*) $p < 0,005$ ; ns = no significativo).

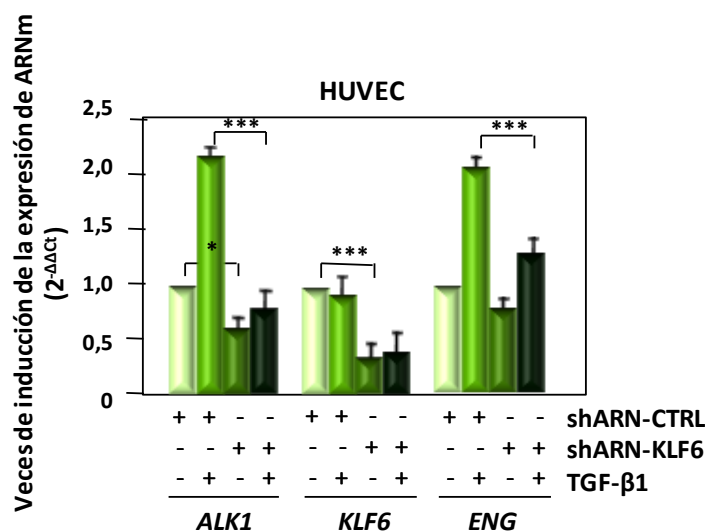
Resultados

### 2.3 El silenciamiento de la expresión de *KLF6* *in vitro* tiene como consecuencia una menor actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1*

Ante la relación temporal existente entre la translocación de *KLF6* al núcleo para activar sus dianas génicas y la activación de la expresión de *ALK1* a nivel transcripcional, surgió la necesidad de corroborar si existía una relación directa entre ambos eventos. Para establecer si existía un nexo entre la presencia de *KLF6* activo en el núcleo y la expresión de *ALK1*, se procedió a suprimir *in vitro* la expresión endógena de *KLF6* mediante transfección de ARN de interferencia pequeño (siARN) dirigido específicamente contra el mensajero de *KLF6*. Para ello, células endoteliales de cultivo primario HUVEC fueron infectadas con partículas retrovirales productoras de shARN (*small hairpin* ARN; ARN con estructura de lazo/horquilla, que se procesa por la enzima Dicer en el citoplasma celular dando siARN lineales) específicos de ARNm de *KLF6*. Se seleccionaron varios clones con el gen *KLF6* silenciado de manera estable mediante el tratamiento con puromicina y se analizó en ellos la expresión de los mensajeros de *ALK1* y *ENG*. En estas células se comprobó que la eficacia del silenciamiento de *KLF6* fue de

un 60%, quedando una expresión neta del 40%. Bajo estas condiciones, los transcritos de *ALK1* disminuyeron al 60%.

Resultados anteriores mostrados en esta tesis demuestran que el tratamiento con dosis bajas y tiempos cortos de TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml durante 3 horas), que activan la ruta de señalización TGF- $\beta$ /ALK1 (Goumans y col., 2002), no ejercen efectos transcripcionales sobre el fragmento de promotor analizado (Figura 19). En cambio, la misma dosis a tiempos más largos (1 ng/ml durante 48 horas) sí tiene como consecuencia la activación génica de *ACVRL1*, produciendo un aumento en la actividad transcripcional de 2,2 veces (Figura 30). Este efecto puede estar mediado por diversos mecanismos directos o indirectos. En cambio, en presencia del interferente de *KLF6*, dicho mecanismo de activación del promotor de *ACVRL1* no tiene lugar, siendo incapaz el ligando de incrementar el número de transcritos en las mismas condiciones de tratamiento. El número de transcritos de *ENG* presentó un perfil similar al de *ALK1*.

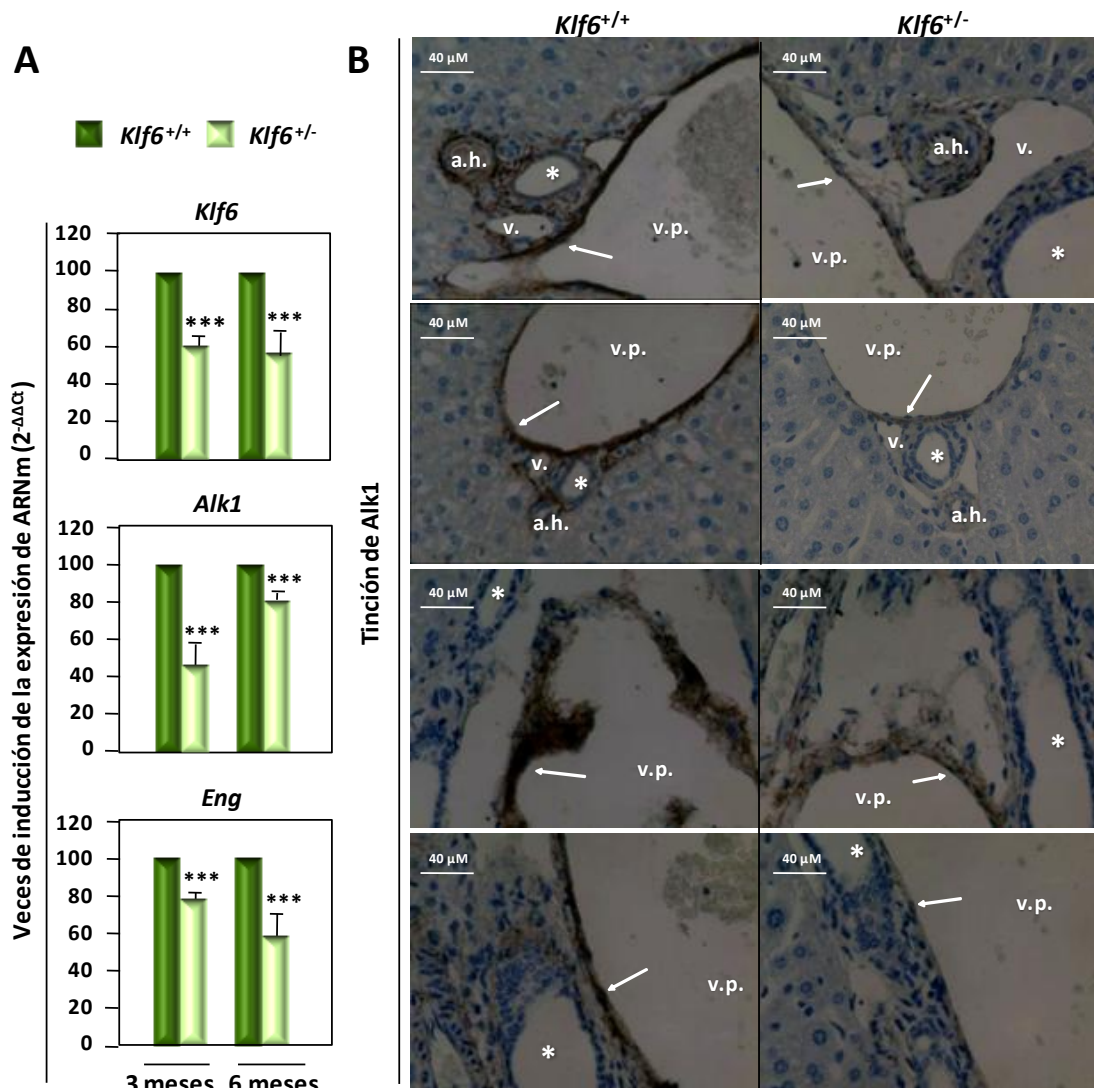


**Figura 30. El silenciamiento de la expresión de *KLF6* en células HUVEC disminuye la tasa de transcripción de *ALK1* e inhibe su activación tras el tratamiento con TGF- $\beta$ .** El cultivo primario de células endoteliales HUVEC fue infectado con partículas retrovirales conteniendo ARNsh (*short hairpin*, precursor de ARN de interferencia pequeño) específico contra el ARNm de *KLF6*. Tras selección con puomicina, se extrajo el ARN de las células y se sometió a RT-PCR en tiempo real para detectar los transcritos de *ALK1* (y *ENG* como control positivo). Los transcritos de *ALK1* disminuyeron en un 40% en condiciones basales. En condiciones normales, el tratamiento con 1 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 horas duplica los niveles de ARNm de *ALK1* mientras que en presencia del ARNsh-*KLF6* este aumento se anula. Como comprobación de la eficacia del silenciamiento se midieron también los niveles de ARNm de *KLF6*, observando un descenso de más de un 60%. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

## 2.4 Los ratones heterocigotos *Klf6*<sup>+/-</sup> presentan una actividad transcripcional de *Acvrl1* disminuida, lo que resulta en una baja expresión de *Alk1* en su vasculatura

Ante la observación de que la supresión de la expresión de *KLF6* (o su disminución) *in vitro* en las células endoteliales tiene como resultado una disminución en la transcripción de

*ACVRL1*, se quiso demostrar esta dependencia estudiando un modelo *in vivo* que mimetizara estas condiciones. Este modelo es el ratón heterocigoto *Klf6*<sup>+/-</sup>.



**Figura 31. Ratones heterocigotos para el gen *Klf6* expresan niveles más bajos de *Alk1*.** **A.** Niveles de ARNm de *Alk1*, *Eng* y *Klf6* analizados por PCR cuantitativa. Los ratones heterocigotos para *Klf6* tienen un 50-60% de expresión de *Klf6*, como cabría esperar. Estos ratones expresan entre un 20%-60% menos de *Alk1* comparado con sus compañeros de camada con expresión normal de *Klf6*. La diferencia es más apreciable en los ratones de 3 meses que en los de 6 meses. Se muestran también los niveles de ARNm de *Eng*. (\*\*\*)p<0,005). **B.** Tinción inmunohistoquímica de *Alk1* en secciones de hígado de ratones *Klf6*<sup>+/-</sup> comparado con ratones *Klf6*<sup>+/+</sup>. La disminución en el número de transcritos de *Alk1* se refleja en la menor expresión de *Alk1* en la capa endotelial de la vasculatura hepática de estos ratones, comparados con los ratones control. Se muestra la tinción de *Alk1* en secciones de tejido hepático embebidas en parafina donde se observa la triada hepática (agrupación de ramificación de arteria y vena hepáticas y del conducto biliar en los ángulos de los lóbulos hepáticos). Vp = vena portal; ah = arteria hepática; v = vena. Las flechas señalan el endotelio y los asteriscos indican los conductos biliares.

Así, se extrajo ARN total de hígados de ratones heterocigotos *Klf6*<sup>+/-</sup> y se analizó su contenido en ARNm de *Alk1*, así como de *Klf6* y *Eng*. Se observó que los niveles de ARNm de *Alk1* eran entre un 60% (en los ratones de 3 meses de vida) y un 20% (en los de 6 meses) menores que en compañeros de camada con expresión normal de *Klf6*. Esto demuestra que,

Resultados

incluso en ausencia de daño vascular, el desarrollo normal de la vasculatura en individuos en crecimiento requiere la presencia de Klf6 para lograr la suficiente expresión de Alk1 en el endotelio. De hecho, los ratones más jóvenes son los que expresan menores niveles de *Alk1* (Figura 31A), apoyando la hipótesis del requerimiento de Klf6 durante el desarrollo postnatal de los vasos.

Para analizar los niveles de expresión de la proteína, se tomaron secciones de vasculatura hepática de estos ratones, se fijaron y embebieron en parafina y se realizó un marcaje inmunohistoquímico para detectar la presencia de Alk1. En concordancia con lo observado por RT-PCR en tiempo real, la expresión de Alk1 en el endotelio tanto de las venas portales, como de las arterias y venas hepáticas de estos ratones es mucho menor que el nivel de expresión mostrado por sus compañeros de camada *Klf6*<sup>+/+</sup> (Figura 31B).

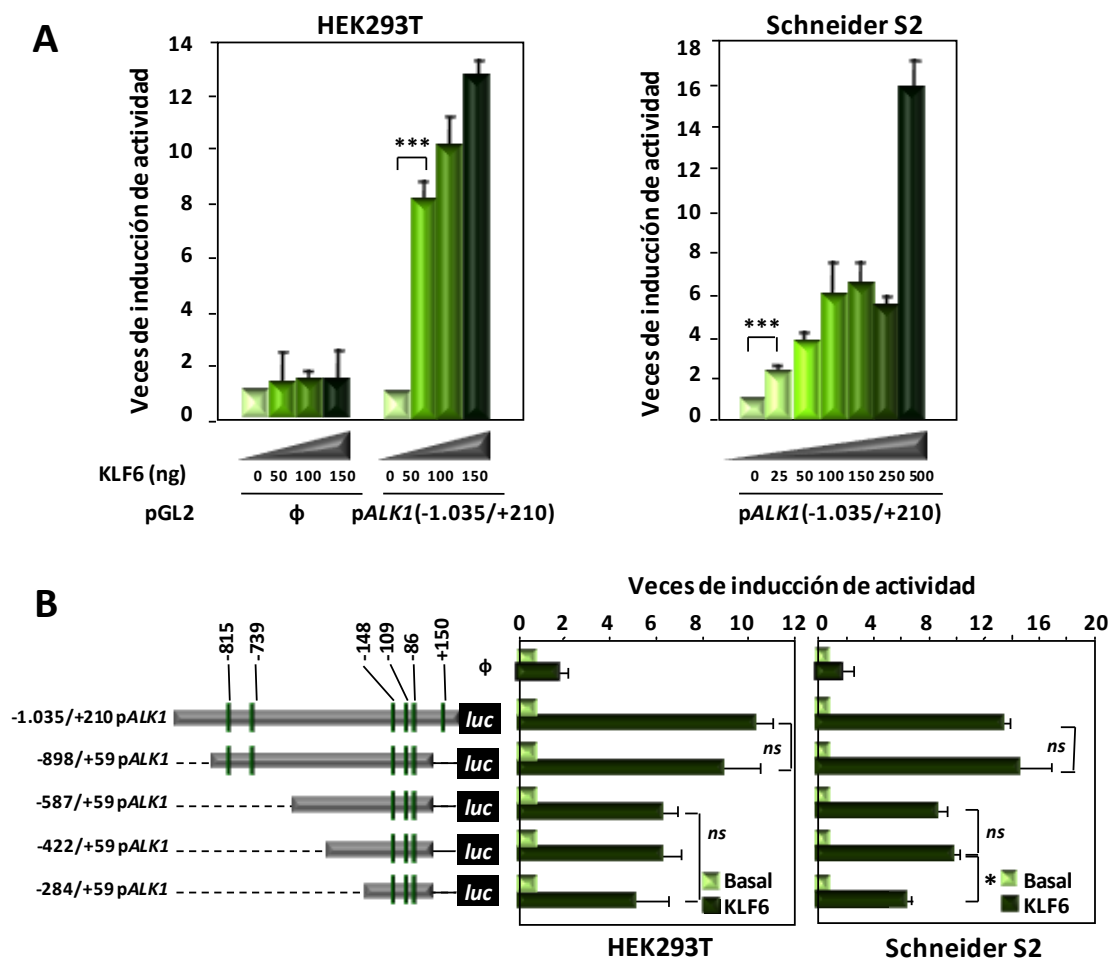
## 2.5 ACVRL1 es un gen diana de KLF6

Para comprobar si la relación proporcional entre la presencia o ausencia de KLF6 y el aumento o disminución de transcritos de ALK1 se debe a que *ACVRL1* es un gen diana de KLF6, se realizaron experimentos de actividad transcripcional de la secuencia -1.035/+210 del promotor de *ACVRL1*, transfectando la construcción pGL2-pALK1-(-1.035/+210)-luc y sobreexpresando KLF6 en el entorno celular. Se observó que la actividad transcripcional del pALK1 aumentaba de modo dosis-dependiente en presencia de KLF6, tanto en células HEK293T como en células Schneider S2, alcanzando niveles de activación de 12-15 veces (Figura 32A). Esto demuestra que ALK1 es una diana génica de la regulación ejercida por KLF6.

El análisis *in silico* efectuado sobre la secuencia del promotor ya había permitido identificar seis posibles sitios de reconocimiento para KLF6 (Figura 16 y Tabla 11), situados en las posiciones -815, -739, -148, -109, -86 y +150. En la Figura 32B se muestra un esquema de la localización de los mencionados sitios KLF6 y su distribución a lo largo de la secuencia -1.032/+210 del pALK1, así como los sitios que permanecen en cada una de las delecciones seriadas del promotor. La construcción con la secuencia -898/+59 del pALK1 conserva cinco de los seis sitios y las construcciones con las secuencias -587/+59, -422/+59 y -284/+59 conservan tres sitios. Al transfectar cada construcción con el vector de expresión de KLF6, se observó que todas ellas se activan en presencia de la dosis máxima de KLF6, tanto en células HEK293T como en células S2, y que esa activación es proporcional al número de sitios KLF6, siendo de la misma magnitud en las construcciones con 6 y 5 sitios. De forma similar, las construcciones de



tres sitios KLF6 también mostraron una actividad parecida entre ellas, y menor a la que mostraron las de 6 y 5 sitios.

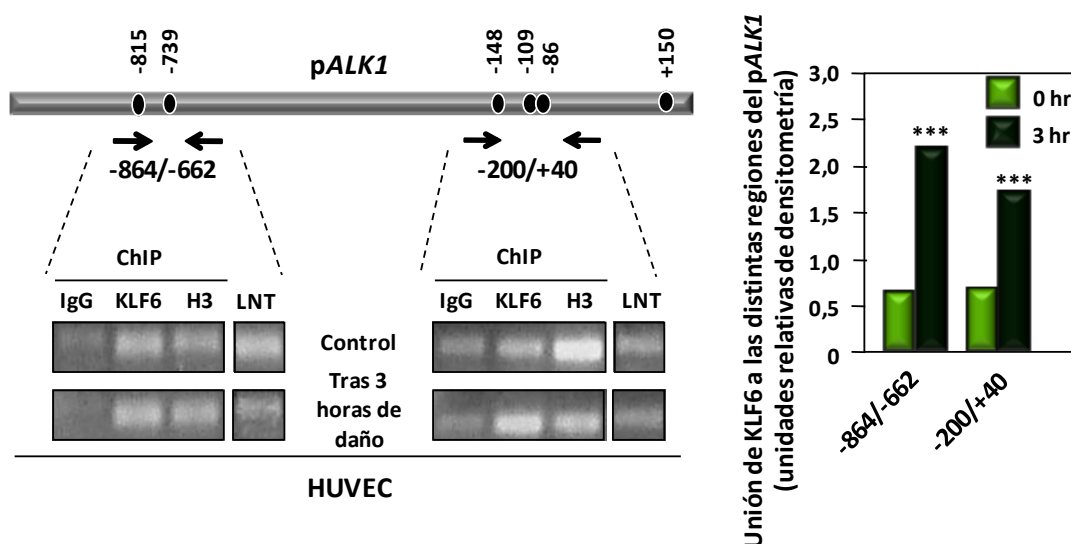


**Figura 32. KLF6 transactiva el promotor de ACVRL1.** **A.** Efecto dosis-respuesta de la sobreexpresión de KLF6 en células HEK293T (izquierda) y Schneider S2 (derecha) sobre la actividad transcripcional del promotor de ACVRL1. Las células se transfectaron con el vector pGL2-pALK1 (que contiene la secuencia -1.035/+210 del pALK1) y con cantidades crecientes de un vector de expresión de KLF6 (pCIneo-KLF6 en el caso de las células de mamífero HEK293T y pAc-KLF6 en el caso de las células de *Drosophila* S2). La actividad luciferasa se corrigió con la actividad de *Renilla* y se expresa como veces de inducción respecto a la actividad transcripcional basal. **B.** KLF6 es capaz de transactivar incluso la construcción más pequeña del promotor de ACVRL1. A la izquierda, se muestra un esquema de las diferentes construcciones generadas mediante delección seriada en 5' del promotor de ACVRL1, indicando con unas barras transversales negras la presencia de sitios teóricos para unión de KLF6. A la derecha se muestra la actividad transcripcional de todas las construcciones en situación basal y tras sobreexpresión de 150 ng de pCIneo-KLF6 en el caso de HEK293T y 500 ng de pAc-KLF6 en el caso de S2. Las actividades se representan normalizadas como las anteriores y en veces de inducción. Se obtienen actividades parecidas entre las construcciones con 6 y 5 sitios KLF6 (-1.035/+210 y -898/+59), y entre las construcciones con 3 sitios KLF6 (-587/+59, -422/+59 y -284/+59). Φ = vector vacío. (\*p<0,05; \*\*\*p<0,005; ns = no significativo).

## 2.6 KLF6 interacciona con la secuencia promotora -1.035/+210 del gen ACVRL1 en células endoteliales *in vivo*

Para demostrar la unión física de KLF6 al promotor de ACVRL1 en la célula endotelial, se realizaron estudios de inmunoprecipitación de cromatina con cultivos primarios de HUVECs,

tanto en situación basal como tras 3 horas del procedimiento de denudación de la monocapa. Se utilizó un anticuerpo anti-KLF6 para inmunoprecipitar la cromatina y se amplificaron dos regiones importantes en el p*ALK1*, al reunir la mayoría de sitios KLF6 teóricos, eligiendo dos parejas de cebadores que flanquean ambas regiones. Estas secuencias comprenden cinco de los seis sitios y son -864/-662 (que contiene los sitios teóricos -815 y -739) y -200/+40 (que contiene los sitios -148, -109 y -86). Tras la amplificación por PCR, se comprobó que KLF6 está unido a ambas secuencias del p*ALK1*, tanto en la situación basal del cultivo endotelial primario, como tras 3 horas del daño endotelial. Al cuantificar la unión mediante densitometría de las bandas, se observó que la unión era mayor a las 3 horas tras el daño. Este resultado coincide perfectamente con lo observado por inmunofluorescencia, apreciándose que, en ese momento temporal, KLF6 ya comienza a estar translocado al núcleo y, por tanto, está activo y unido a las dianas génicas que regula.



Resultados

**Figura 33. KLF6 interacciona con el promotor de *ACVRL1* en células HUVECs y esta interacción aumenta tras el daño a la monocapa endotelial.** A la izquierda, se muestra el resultado de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos anti-KLF6 y la posterior amplificación de las regiones de interés en el promotor de *ACVRL1*. Se muestra también el control negativo (inmunoprecipitando con una mezcla de IgGs de conejo) y el control positivo (con anti-Histona 3). Cada experimento de ChIP está realizado tanto en situación control como tras dañar la monocapa endotelial en la placa de cultivo (a las 3 horas). Para la amplificación de las regiones de ADN de interés situadas en el promotor de *ACVRL1* se eligieron dos parejas de cebadores. De ese modo se amplifican las dos regiones con mayor presencia de elementos de respuesta teóricos a KLF6: -872/-670 (abarca los sitios -815 y -739) y -208/+38 (abarca los sitios -148, -109 y -86). IgG = inmunoglobulina; H3 = Histona 3; LNT = lisado nuclear total, sin inmunoprecipitar. A la derecha se muestra la cuantificación de las bandas de PCR procedentes del experimento de ChIP. La cuantificación de la unión de KLF6 a ambos sitios se realizó mediante densitometría de las bandas y se representan las relaciones (KLF6-IgG)/LNT en cada región amplificada (\*\*\*)  $p < 0,005$ .

Estos resultados se muestran en la Figura 33 y, junto con los datos de actividad luciferasa, demuestran que *ALK1* es una diana natural de KLF6, de forma que KLF6 transactiva el promotor de *ALK1* para inducir su expresión tras un daño endotelial.

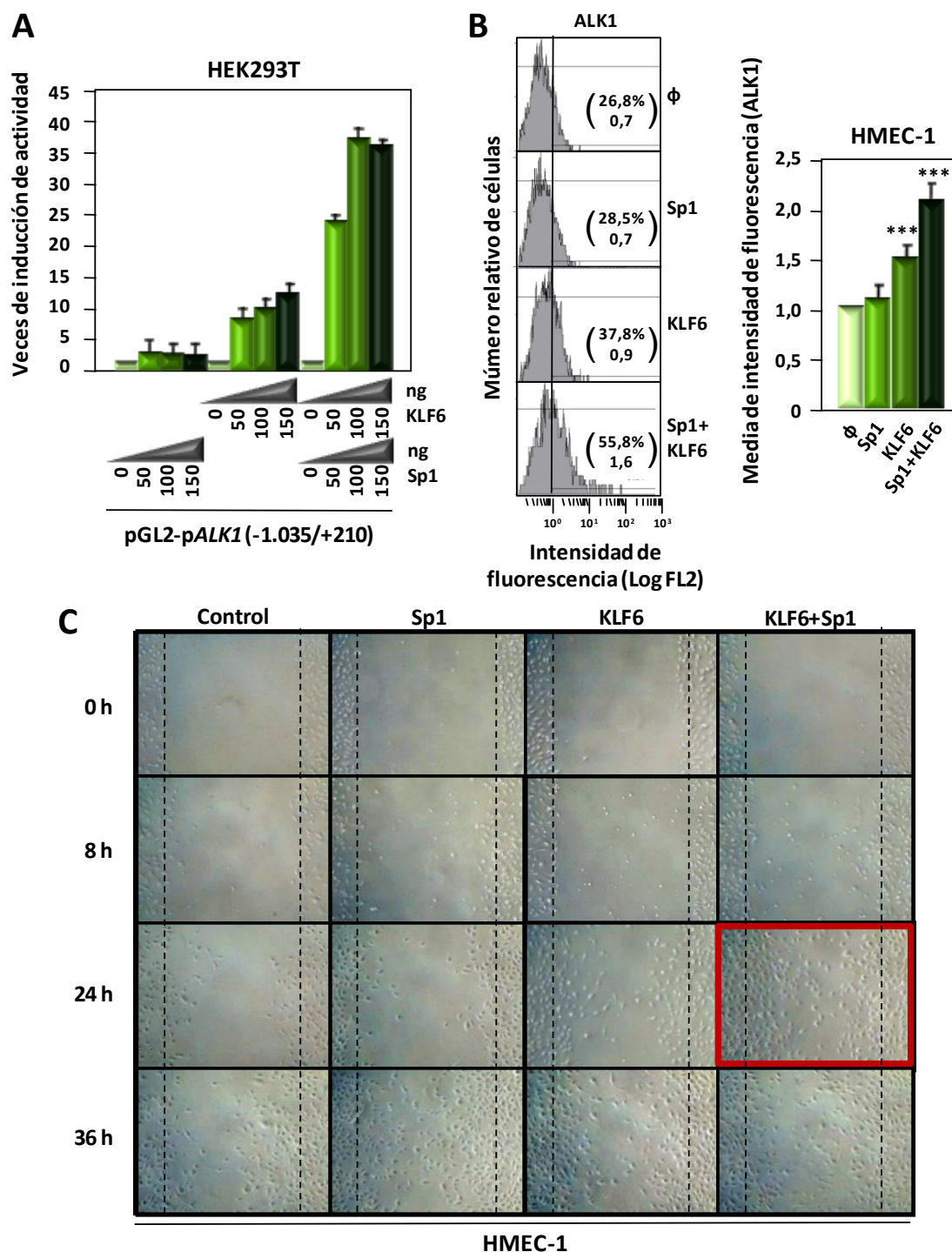


## 2.7 KLF6 transactiva el promotor de *ACVRL1* mediante un mecanismo de cooperación sinérgica con Sp1

Sabiendo que el mecanismo de transcripción basal de ALK1 se debe a la presencia de Sp1, y teniendo en cuenta que Sp1 presenta múltiples posibilidades de interacción con otros factores (Figura 11), se estudió la posible relación de los dos factores (KLF6 y Sp1) en el contexto transcripcional del pALK1. Se analizó el efecto de la transactivación ejercida por KLF6 sobre la construcción -1.035/+210 del pALK1 en presencia y ausencia de Sp1 (ausencia relativa puesto que las células HEK293T expresan Sp1 endógeno). Se observó que Sp1 induce, por sí solo, 5 veces la actividad transcripcional del pALK1, mientras que KLF6 lo induce 12 veces. Sorprendentemente, la presencia de ambos factores inducía niveles de actividad del promotor 37 veces superiores a la actividad basal, indicando que KLF6 actúa mediante un mecanismo de cooperación sinérgica con Sp1 sobre el promotor de *ACVRL1* (Figura 34A). Esto quiere decir que conjuntamente se potencian entre sí, en vez de ejercer un efecto correspondiente al sumatorio de sus actividades por separado. Normalmente, este efecto se produce cuando se suma el efecto de la unión Sp1 a las cajas GC cercanas al promotor y el efecto de factores de crecimiento o factores específicos de tejido (como es el caso de KLF6, específico de célula estelada hepática y célula endotelial, fundamentalmente) unidos a elementos de respuesta propios, cercanos a los sitios Sp1. De este modo, forman un complejo transcripcional que, unido a la maquinaria de transcripción basal, consigue niveles de transactivación sobre el promotor diana muy superiores a los obtenidos por los factores unidos individualmente.

Para evaluar el efecto de esta cooperación en la biología de la célula endotelial, células endoteliales HMEC-1 se transfectaron con pCIneo-Sp1 y pCIneo-KLF6 y se analizó su capacidad de cerrar la herida tras el procedimiento de denudación antes mencionado. Se observó que las células con sobreexpresión de Sp1 y KLF6 cerraban la herida mucho más rápido que las que sólo sobreexpresaban uno de los dos factores, mimetizando de modo mucho más realista la situación real de daño endotelial donde los niveles de KLF6 aumentan. A las 24 horas las diferencias se aprecian claramente (Figura 34B). Para comprobar que esta mayor proliferación y migración de las células tiene relación con el aumento de ALK1 se analizaron sus niveles en membrana por citometría de flujo. Se observó que la expresión de ALK1 en la membrana de células HMEC-1 con sobreexpresión de Sp1 y KLF6 era el doble que en las células control.

Resultados



Resultados

**Figura 34. KLF6 coopera funcionalmente con Sp1 mediante un mecanismo sinérgico para activar la transcripción del promotor de ACVRL1.** **A.** Actividad luciferasa de la construcción pGL2-pALK1 (-1.035/+210) cotransfectada con las combinaciones indicadas de pCneo-KLF6 y pCneo-Sp1, en células HEK293T. La actividad luciferasa se midió tras 48 horas y se representa respecto a la actividad de la construcción en ausencia de ambos vectores de expresión (a esta actividad basal se le ha asignado arbitrariamente el valor 1). **B.** Expresión de ALK1 en membrana de células HMEC-1 cotransfectadas con pCneo-KLF6 y pCneo-Sp1, tras 72 horas, medida por citometría de flujo. Los números entre paréntesis hacen referencia al porcentaje de células positivas y a la intensidad media de fluorescencia, respectivamente. A la derecha se muestra una gráfica que representa las intensidades medias de fluorescencia de ALK1, considerando la muestra transfectada con pGL2-pALK1 y pCneo-φ (vector vacío) como la condición basal, y asignándole valor 1. (\*\*p<0,005). **C.** Ensayo de cierre de herida o *wound healing* con células HMEC-1 en condiciones control, sobreexpresando Sp1, KLF6 o ambos. Tras 24 horas de la rotura de la monocapa endotelial, se observa que el cierre de la herida se produce con más rapidez en la condición Sp1+KLF6, debido a una mayor migración y proliferación de las células endoteliales.

### 3 Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al estímulo hipóxico

#### 3.1 La expresión de ALK1 en células endoteliales aumenta en situación de hipoxia

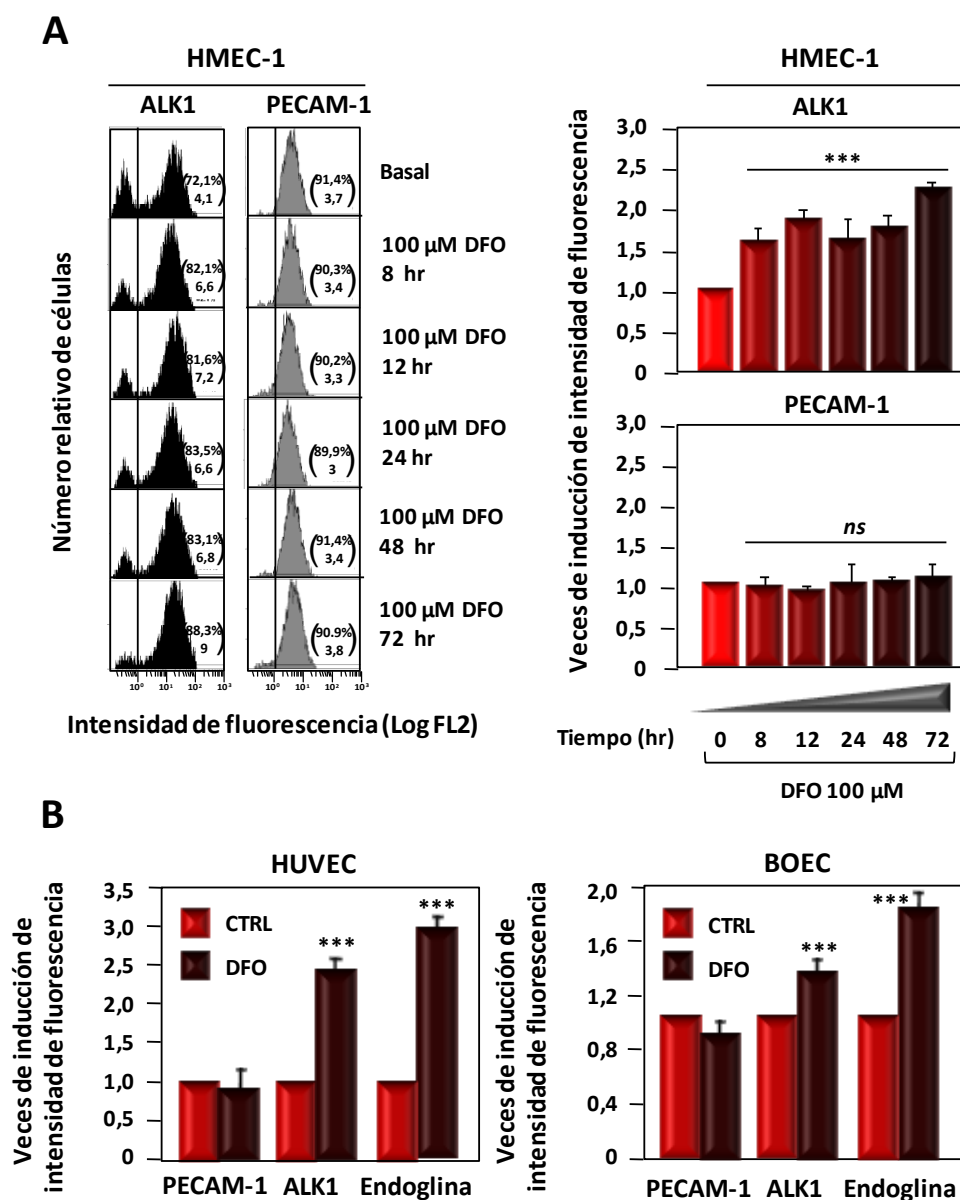
La elevada expresión de ALK1 en los vasos sanguíneos, así como el hecho de que mutaciones en el gen que lo codifica (*ACVRL1*) den lugar a la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 2 (HHT2), caracterizada por malformaciones arteriovenosas y aparición de estructuras vasculares aberrantes, demuestran el papel clave que esta molécula tiene durante la angiogénesis. Además, su función en la morfogénesis vascular es evidente ya que los ratones deficientes en expresión de ALK1 homocigotos mueren a mitad de la gestación debido a malformaciones vasculares graves caracterizadas fundamentalmente por fusiones entre capilares e hiperdilatación de grandes vasos (Oh y col., 2000).

La hipoxia es uno de los principales estímulos que dan lugar a la activación de la angiogénesis para crear nuevos vasos que irrigen zonas que han sido dañadas, obstruidas por un coágulo, e incluso tejidos de nueva formación (como es el caso del endometrio durante la gestación). La hipoxia desencadena respuestas rápidas (hiperventilación, vasodilatación, una mayor producción de glóbulos rojos y angiogénesis) y está mediada fundamentalmente por la acción del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ . Son muchos los genes involucrados en angiogénesis que son modulados por dicho factor, entre ellos: VEGF, endoglina, angiopoyetina-2, Tie-2, angiopoyetina-1, PDGF, receptor uPA, etc.

Resultados

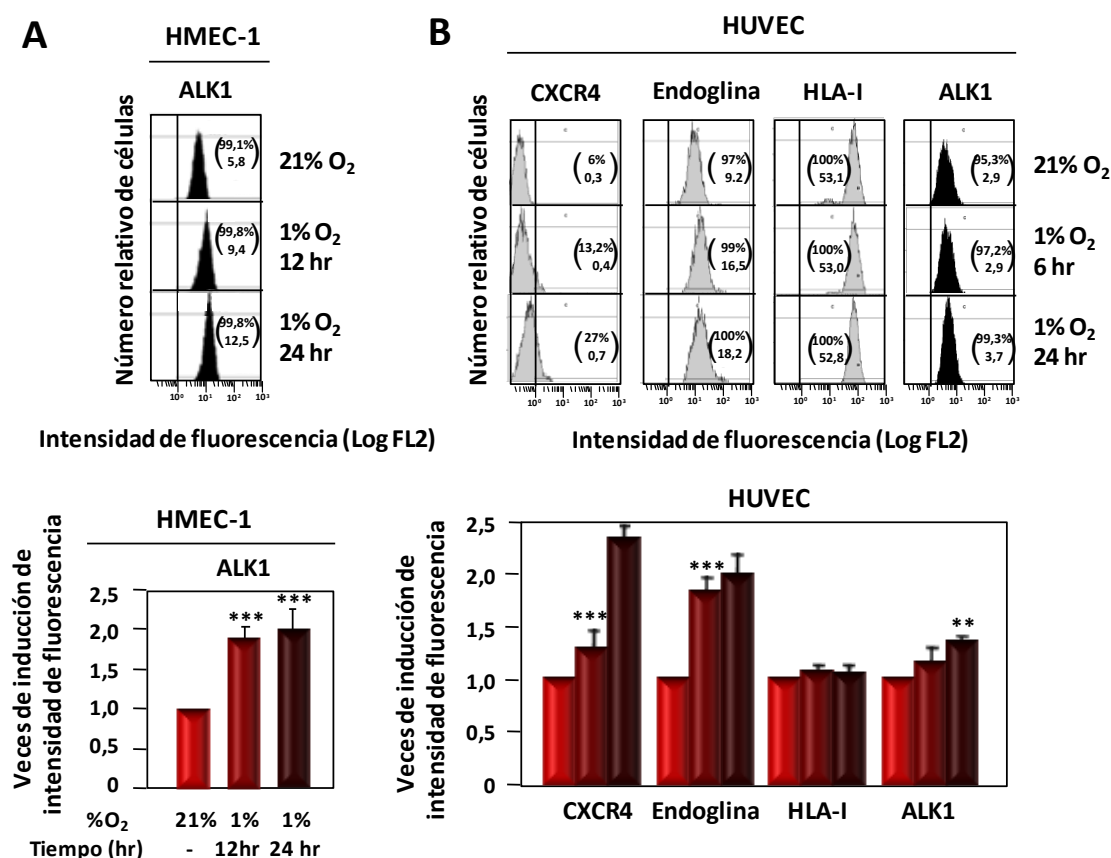
Teniendo en cuenta el papel importante que juega ALK1 durante la angiogénesis, y debido a que la angiogénesis se modula en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno, el tercer objetivo de la tesis se ha orientado a estudiar la posible regulación de ALK1 en respuesta a la hipoxia. Para analizar la expresión de ALK1 en situación de hipoxia se llevaron a cabo dos estrategias experimentales. Como una primera aproximación, la línea celular inmortalizada de endotelio HMEC-1 se trató con el quelante de hierro desferrioxamina (DFO), que actúa como factor mimético de la hipoxia real al secuestrar el ión Fe<sup>2+</sup>, cofactor necesario para la actividad de las prolil-hidroxilasas. En consecuencia, la DFO inhibe a las prolil-hidroxilasas, frenando así la continua degradación citoplásmica de HIF-1 $\alpha$  y permitiendo su translocación a núcleo. Al someter las células a una concentración 100  $\mu$ M de DFO (determinada por trabajos anteriores sobre células endoteliales) se observó, por citometría de flujo, que los niveles de ALK1 en la membrana de estas células aumentaron 1,5 veces a las 8 horas, y hasta 2,3 veces a las 72 horas. En cambio, los niveles de otra molécula característica de la membrana de la célula endotelial, PECAM-1 (*Platelet endotelial cell adhesion molecule-1*), no variaron (Figura 35A). Además, cultivos primarios de células endoteliales (HUVEC y BOEC) se sometieron al mismo

tratamiento con DFO a concentración 100  $\mu$ M durante 24 horas, observándose un aumento de la expresión de ALK1 en membrana de 2,5 y 1,4 veces, respectivamente. En estas células, los niveles de endoglina (conocida diana de HIF-1 $\alpha$ ) aumentaron 3 y 1,8 veces, respectivamente, mientras que los niveles de PECAM-1 no se vieron modificados (Figura 35B).



**Figura 35. La expresión de ALK1 en la superficie de células endoteliales aumenta tras el tratamiento con desferrioxamina (DFO).** **A.** Citometría de flujo de ALK1 y PECAM-1 en células HMEC-1 sometidas a condiciones que mimetizan la hipoxia celular, mediante el tratamiento con desferrioxamina (DFO) a concentración 100  $\mu$ M, a distintos tiempos. La expresión de ALK1 aumenta en membrana mientras que la expresión de PECAM-1 no cambia. A la izquierda se muestran los perfiles de citometría de flujo (Los números entre paréntesis hacen referencia al porcentaje de células positivas y a la intensidad media de fluorescencia, respectivamente) y a la derecha la gráfica que representa la intensidad de fluorescencia de cada condición. **B.** Citometría de flujo de ALK1, PECAM-1 y endoglina en la superficie de células procedentes de cultivo primario (HUVEC y BOEC) tras 24 horas de tratamiento con DFO a concentración 100  $\mu$ M. Los niveles de expresión de ALK1 aumentan entre 1,4 veces (BOEC) y 2,5 veces (HUVEC), así como los del control positivo (endoglina). La expresión de PECAM-1, en cambio, no se ve afectada (\*\*\*) $p < 0,005$ ; ns = no significativo).

Tras la observación del incremento de la expresión de ALK1 por el tratamiento con DFO, y, para excluir que el aumento de ALK1 no fuera debido a un artefacto producido por el quelante, se analizó el efecto de bajas presiones de oxígeno mediante cultivo de las células en una cámara de hipoxia. La concentración de oxígeno en la cámara es del 1%, simulando la presencia límite de oxígeno a la que un tejido puede verse sometido (siendo la concentración en normoxia del 21%). Al cultivar la línea HMEC-1 durante 12 horas en estas condiciones, se observó un aumento de la expresión de ALK1 en membrana de 1,8 veces, y de casi 2 veces tras 24 horas (Figura 36A). Además, el cultivo primario de HUVECs en las mismas condiciones experimentó un aumento de expresión de ALK1 en membrana de 1,4 veces, así como de otros genes diana de HIF-1 $\alpha$ : el receptor de quimioquinas CXCR4 (*CXCR4*) y endoglina (*ENG*). Como control, los niveles de expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (HLA-I) no variaron (Figura 36B).

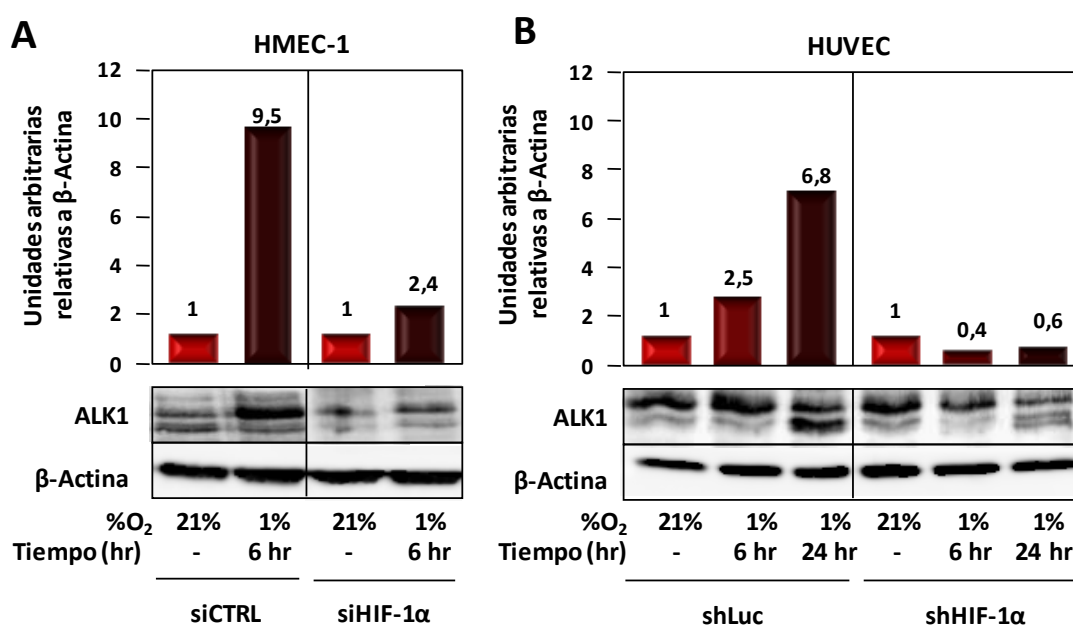


Resultados

**Figura 36. La expresión de ALK1 en la superficie de células endoteliales aumenta tras el cultivo en cámara de hipoxia. A.** Expresión de ALK1, medida por citometría de flujo, en células HMEC-1 sometidas a una atmósfera normóxica (21% de O<sub>2</sub>), o hipóxica (1% O<sub>2</sub>), durante 12 y 24 horas. Los números entre paréntesis hacen referencia al porcentaje de células positivas y a la intensidad media de fluorescencia, respectivamente. En la parte inferior, se representa una gráfica con la intensidad de fluorescencia de cada condición. **B.** Expresión de ALK1, endoglina, CXCR4 y HLA-I, medida por citometría de flujo, en el cultivo primario de células HUVEC en normoxia, y tras el cultivo en cámara de hipoxia durante 6 y 24 horas. La expresión de ALK1, así como la de otras proteínas cuyos genes son dianas conocidas de HIF-1 $\alpha$ , como son el receptor de quimioquinas CXCR4 (*CXCR4*) y endoglina (*ENG*), aumentaron en hipoxia. Como control negativo, se midieron los niveles de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (HLA-I), cuyos niveles no se modificaron (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005; ns = no significativo).

### 3.2 El aumento de ALK1 durante hipoxia es dependiente de la presencia de HIF-1 $\alpha$

ALK1 aumenta su expresión en respuesta a la hipoxia detectada por la célula endotelial. Para investigar si este aumento de expresión de ALK1 estaba mediado por el factor HIF-1 $\alpha$ , se silenció la expresión de dicho factor tanto en la línea celular HMEC-1 como en el cultivo primario de HUVECs. Para ello, se siguieron dos estrategias: transfección de siARN específico de HIF-1 $\alpha$  en las HMEC-1 (Figura 37A), e infección de los cultivos de HUVEC con partículas retrovirales portadoras de shARN específico de HIF-1 $\alpha$  (ya que estas células son más difíciles de transfectar) (Figura 37B). En ambos casos, tras 6 horas de cultivo en cámara de hipoxia, usando un ARN interferente irrelevante, los niveles de ALK1, estudiados por *western blot*, aumentaron 9,5 y 6,8 veces, respectivamente. Por el contrario, en presencia del ARN interferente específico de HIF-1 $\alpha$ , los niveles cayeron de 9,5 a 2,4 y de 6,8 a 0,6, respectivamente. Estos resultados demuestran que la inducción de la expresión de ALK1 en la célula endotelial en respuesta a hipoxia está mediada por HIF-1 $\alpha$ .

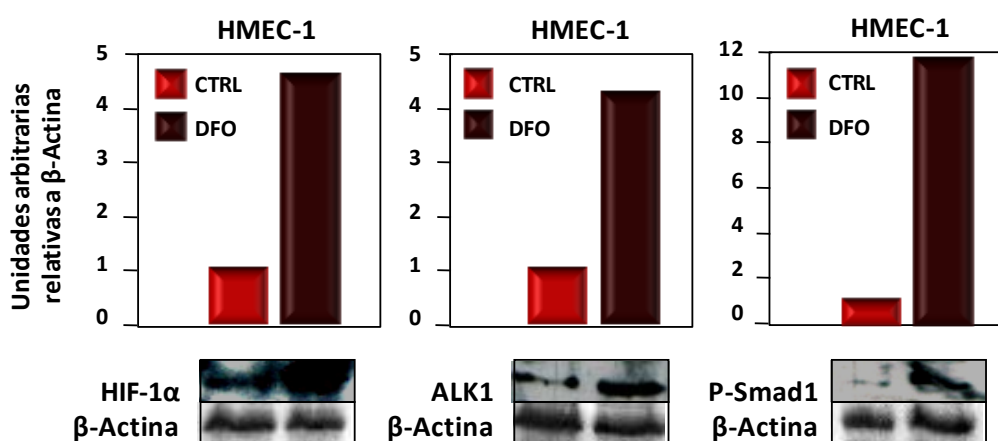


Resultados

**Figura 37. El aumento en los niveles de expresión de proteína ALK1, en hipoxia, es dependiente de la presencia de HIF-1 $\alpha$ .** **A.** Niveles de expresión de ALK1 medidos por *western blot* en células HMEC-1 cultivadas en normoxia y en hipoxia, tras la transfección con un siARN irrelevante (siCTRL) o con un siARN específico de HIF-1 $\alpha$  (siARN- HIF-1 $\alpha$ ). En hipoxia, los niveles de ALK1 aumentan 9,5 veces respecto a normoxia, y este efecto se ve anulado si se suprime la expresión de HIF-1 $\alpha$ . **B.** Niveles de expresión de ALK1 medidos por *western blot* en células HUVEC procedentes de cultivos primarios, en normoxia o en hipoxia, tras la infección con partículas retrovirales portadoras del shARN-HIF-1 $\alpha$  (precursor del siARN-HIF-1 $\alpha$ ), o con un silenciador contra una proteína no presente en el medio celular (luciferasa, shLuc). El aumento de expresión de ALK1 en hipoxia, que llega a ser de 6,8 veces respecto a normoxia, se anula completamente en presencia del shARN-HIF-1 $\alpha$ . Los diagramas de barras muestran las densitometrías de las bandas de ALK1, normalizadas respecto a las de  $\beta$ -actina, en cada condición, y se representan en unidades arbitrarias.

### 3.3 La ruta de señalización de ALK1 se activa en condiciones de hipoxia, en paralelo al aumento en los niveles de ALK1

Con la intención de examinar si el aumento en los niveles de ALK1 debido a la hipoxia daba lugar a una activación de la señalización mediada por ALK1 hacia sus genes diana, se analizaron los niveles de fosforilación, y por tanto de activación, de su efector Smad1, por *western blot*. Tras el tratamiento con DFO a concentración 100  $\mu$ M durante 24 horas, la expresión de ALK1 en las células HMEC-1 aumentó notablemente, en paralelo al aumento en los niveles de HIF-1 $\alpha$  y a la notable fosforilación de Smad1 (Figura 38). Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de ALK1 mediada por HIF-1 $\alpha$  da lugar a una activación funcional de la cascada de señalización ALK1/Smads.



Resultados

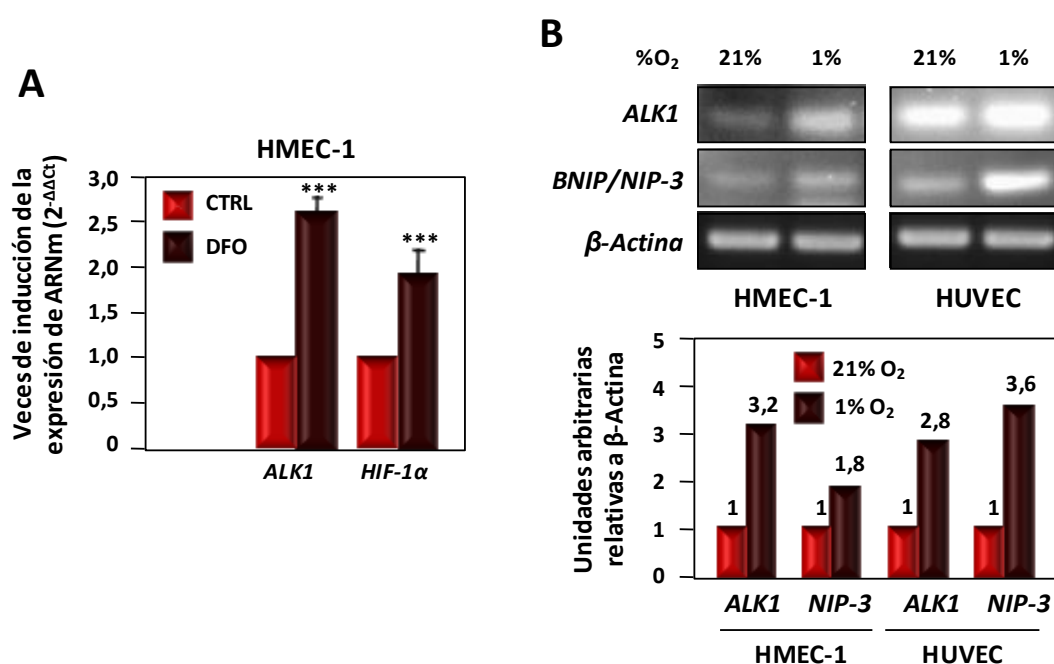
**Figura 38.** El aumento en los niveles de ALK1, en respuesta a hipoxia, va asociado con un aumento en los niveles de activación de la vía de señalización ALK1/Smad1. Niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$ , ALK1 y fosfo-Smad1 en células HMEC-1, medidos por *western blot*, tras tratamiento con DFO a concentración 100  $\mu$ M durante 24 horas. Se observa un aumento en la expresión de ALK1, detectándose además un aumento de HIF-1 $\alpha$ . En estas mismas condiciones, Smad1 se fosforila, debido a la activación de la ruta de señalización mediada por ALK1. Los diagramas de barras muestran las densitometrías de las bandas de HIF-1 $\alpha$ , ALK1 y fosfo-Smad1, normalizadas respecto a las de  $\beta$ -actina, en cada condición, y se representan en unidades arbitrarias.

### 3.4 El aumento en la expresión de ALK1 se debe a un incremento de los niveles de ARNm

Para indagar el tipo de mecanismo de regulación al que se ve sometida la expresión de ALK1, se estudiaron los niveles de ARNm de ALK1 en HMEC-1 antes y después del tratamiento con DFO, y los niveles de ARNm en HMEC-1 y HUVEC tras el cultivo en cámara de hipoxia. En hipoxia química (DFO), se observó un aumento de ARNm de ALK1 de 2,6 veces en HMEC-1 (Figura 39A) y un aumento de ARNm de HIF-1 $\alpha$  de 2 veces. Tras cultivo en cámara de hipoxia, los niveles de ALK1 aumentaron, asimismo, 3,2 veces y 2,8 veces, en HMEC-1 y HUVEC,



respectivamente (Figura 39B). Como control positivo del funcionamiento de la hipoxia, se estudiaron los niveles de una diana clásica de HIF-1 $\alpha$ , el factor BNIP/NIP-3 (*Bcl-2/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3*), una proteína proapoptótica muy sensible a la presencia de HIF-1 $\alpha$  (Manalo y col., 2005), observándose una inducción en sus niveles de ARNm de 1,8 y 3,6 veces, en células HMEC-1 y HUVEC, respectivamente. Con estos experimentos, se comprobó que la inducción de la expresión de ALK1 se debe, al menos en gran parte, a una regulación transcripcional.



**Figura 39.** El aumento en la expresión de ALK1 durante la hipoxia se debe a un incremento en sus niveles de ARN mensajero. **A.** PCR en tiempo real de ARN procedente de células HMEC-1 tras tratamiento con DFO a concentración 100  $\mu$ M durante 6 horas. Los niveles de ARNm de ALK1 aumentaron 2,7 veces en respuesta a hipoxia. La expresión de ARNm de HIF-1 $\alpha$  también se induce (al doble), si bien el incremento en los niveles de HIF-1 $\alpha$  durante la hipoxia se debe, principalmente, a una parada en su degradación (\*\*\*) $p < 0,005$ ). **B.** PCR semicuantitativa de los niveles de ARNm de ALK1 y de BNIP/NIP-3 (gen diana de HIF-1 $\alpha$ ) en células HMEC-1 y HUVEC sometidas a atmósfera normóxica e hipóxica, tras 6 horas. Los niveles de mensajero de ALK1 aumentan tras la hipoxia, en ambos tipos de cultivos celulares endoteliales. En la parte inferior del panel se muestran los histogramas procedentes de las densitometrías de las bandas de RT-PCR, respecto a  $\beta$ -Actina.

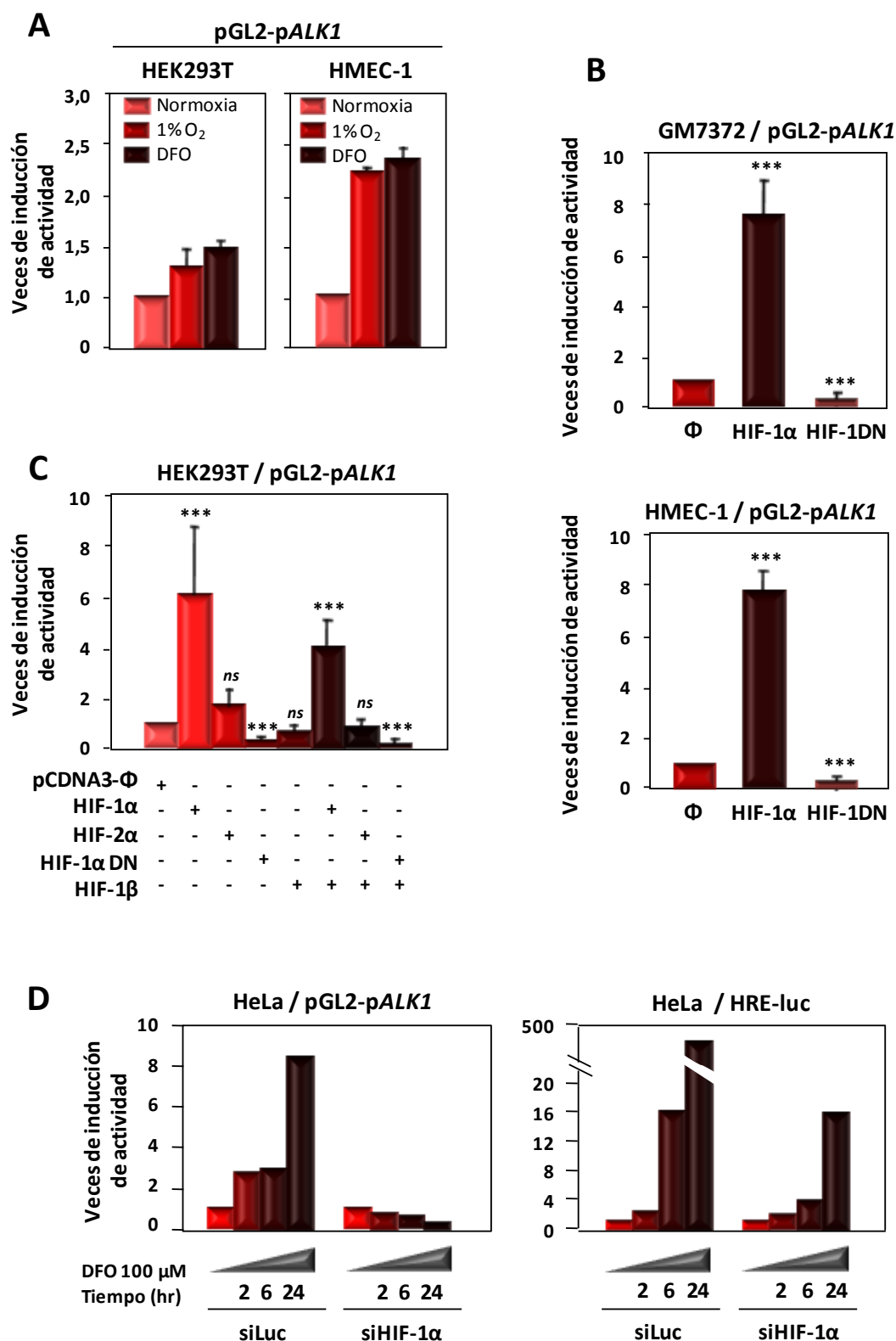
### 3.5 ACVRL1 es una diana transcripcional de HIF-1 $\alpha$

Si el aumento de ALK1 por hipoxia se debe a regulación transcripcional, y dicho aumento de expresión se anula en ausencia de HIF-1 $\alpha$ , es razonable asumir la existencia de una regulación directa entre dicho factor de transcripción y el promotor de ALK1. Para estudiar si



existía respuesta transcripcional del promotor de *ACVRL1* ante la hipoxia, la construcción reportera del promotor de *ACVRL1*, pGL2-p*ALK1*, se transfectó transitoriamente en células HEK293T y HMEC-1, y las células se cultivaron en hipoxia, observándose una activación transcripcional del promotor de *ACVRL1* de 1,2 y 2,4 veces, respectivamente (Figura 40A). Una transactivación similar del promotor de *ACVRL1* se observó al sobreexpresar HIF-1 $\alpha$  por transfección transitoria de su vector de expresión en células endoteliales humanas (HMEC-1) y bovinas (GM7372) (Figura 40B). Además, esta transactivación se anuló completamente cuando se transfectó la forma dominante negativa de HIF-1 $\alpha$  (isoforma 4 de HIF-3 $\alpha$ ). Esto demuestra que ALK1 es una diana regulada transcripcionalmente por HIF-1 $\alpha$ , y que deben existir sitios de reconocimiento de HIF-1 $\alpha$  dependientes de secuencia que sean funcionales en el promotor de *ACVRL1*, a través de los cuales HIF-1 $\alpha$  esté ejerciendo su acción.

Se sabe que los factores HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  a menudo tienen efecto redundante o comparten algunas de sus dianas génicas. Por ello, se quiso comprobar la especificidad del efecto transactivador de HIF-1 $\alpha$  sobre el promotor de *ACVRL1*. Se hicieron ensayos de transfección transitoria de HIF-1 $\alpha$  (sin y con HIF-1 $\beta$ ) y de HIF-2 $\alpha$  (sin y con HIF-1 $\beta$ ) en células HEK293T, demostrando que la activación del pGL2-p*ALK1* sólo ocurre en presencia de HIF-1 $\alpha$  y no de HIF-2 $\alpha$  (Figura 40C). Además, se hicieron ensayos de silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células HeLa mediante cotransfección de un siARN específico de HIF-1 $\alpha$  junto con el vector pGL2-p*ALK1*, para evaluar si el fragmento de promotor de *ACVRL1* sometido a estudio conservaba esa activación en respuesta a la hipoxia. Se trataron posteriormente las células HeLa cotransfectadas con DFO a concentración 100  $\mu$ M durante 2, 6 y 24 horas, en presencia de un siARN irrelevante o del siARN específico de HIF-1 $\alpha$ . Se observó que la actividad del promotor aumentó 8 veces tras 24 horas de tratamiento con DFO en presencia del siARN irrelevante, mientras que la activación no se produjo en presencia del siARN específico de HIF-1 $\alpha$ . Como control, se hizo en paralelo el mismo experimento con un reportero de actividad de HIF-1 $\alpha$  muy sensible, el HRE-luc, que posee varios elementos de respuesta a hipoxia en tándem. Su respuesta fue una inducción de 500 veces tras tratamiento con DFO, mientras que en presencia del siARN-HIF-1 $\alpha$ , la inducción se redujo a 16 veces (su alta sensibilidad a la presencia de HIF-1 $\alpha$  y el hecho de que la efectividad del silenciamiento nunca sea del 100% hace que no se anule por completo su activación, pero es un claro reportero de la efectividad del silenciamiento) (Figura 40D). Todos estos datos demuestran que el fragmento estudiado del promotor de *ACVRL1* es capaz de responder a la hipoxia mediada por el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , de modo específico.



Resultados

**Figura 40.** El promotor de *ACVRL1* responde a la hipoxia y este efecto está mediado por HIF-1α. **A.** Actividad transcripcional de la construcción pGL2-pALK1 en células HEK293T (epiteliales) y HMEC-1 (endoteliales), tanto en normoxia, como en hipoxia o tras tratamiento con DFO durante 6 horas. En las células HEK293T, la actividad transcripcional del pALK1 aumenta 1,5 veces en hipoxia y en presencia de DFO; mientras que en las células HMEC-1, la actividad transcripcional del promotor de *ALK1* aumenta 2,5 veces bajo estas condiciones. La actividad luciferasa se normalizó respecto a la actividad de *Renilla*. **B.** Actividad transcripcional de la construcción pGL2-pALK1 tras cotransfección de la misma con el vector de expresión de HIF-1α o con una isoforma dominante negativa (HIF-1αDN

isoforma 4 de HIF-3 $\alpha$ ), en células endoteliales tanto bovinas (GM7372) como humanas (HMEC-1). La actividad transcripcional de la construcción aumenta 8 veces en presencia de HIF-1 $\alpha$ , mientras que, en presencia de la forma dominante negativa de HIF-1 $\alpha$ , su actividad incluso disminuye. **C.** Cotransfección de la construcción pGL2-pALK1 con vectores de expresión de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ DN y HIF-1 $\beta$  en células HEK293T. La actividad transcripcional del pALK1 aumenta en presencia de HIF-1 $\alpha$  (tanto sobreexpresando también HIF-1 $\beta$  como solamente HIF-1 $\alpha$ ), y no en presencia de HIF-2 $\alpha$  ni HIF-1 $\alpha$ DN. **D.** Actividad transcripcional de la construcción pGL2-pALK1 (izquierda) y de la construcción reportera de HIF-1 $\alpha$  (HRE-luc) (derecha), en situación control y tras el tratamiento con DFO (a concentración 100  $\mu$ M, durante 2, 6 y 24 horas), en presencia de un siARN irrelevante (siLuc) o de un siARN específico de HIF-1 $\alpha$  (siHIF-1 $\alpha$ ), en células HeLa. La actividad del pALK1 aumenta 8 veces tras 24 horas de tratamiento con DFO, mientras que esa activación desaparece completamente en presencia del siHIF-1 $\alpha$ . Asimismo, la inducción de la actividad del reportero HRE-luc pasa de  $\approx$ 500 veces a  $\approx$ 16, lo que demuestra la eficacia del silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  (\*\* $p < 0,005$ ; ns = no significativo).

### 3.6 Identificación de un sitio funcional de respuesta a HIF-1 $\alpha$ en el promotor de ACVRL1, responsable de su activación transcripcional en hipoxia

En el análisis *in silico* efectuado sobre el promotor de ACVRL1 se detectó la presencia de tres sitios teóricos de respuesta a hipoxia (HRE) en la secuencia -1.035/+210 del promotor de ACVRL1 sometida a estudio. Estos sitios corresponden a las posiciones -808/-791, -288/-271 y -236/-220. De estos tres sitios, sólo el sitio -288/-271 conservaba el consenso perfecto 5'-**ACGT**-3'. Además, se hizo una búsqueda de sitios HRE abarcando una zona algo mayor (-1.573/+210) que la clonada en pGL2 (-1.035/+210) y se descubrió otro sitio HRE teórico cercano, situado en -1.339/-1.325, que también coincidía perfectamente con el consenso 5'-**ACGT**-3'. De este modo, se quiso analizar la funcionalidad de los cuatro sitios teóricos HRE, a los que llamamos HRE1 (-1.339/-1.325), HRE2 (-808/-791), HRE3 (-288/-271) y HRE4 (-236/-220), mediante ensayos de movilidad electroforética retardada. Para ello, se generaron sondas de doble cadena de ADN conteniendo los cuatro sitios, abarcando, en cada caso, las regiones indicadas a continuación: HRE1 (-1.351/1.303), HRE2 (-823/-780), HRE3 (-300/-250) y HRE4 (-242/-215). Además, se observó que el sitio HRE3 (-288/-271) tiene un consenso teórico de unión a Smad4 5'-**AGTCT**CGGC-3' en una posición adyacente a él. Este hecho es de interés por la posibilidad de cooperación entre HIF-1 $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1, como sucede en otros promotores de genes relacionados, como VEGF, ENG y EPO (Sanchez-Elsner y col., 2001; Sanchez-Elsner y col., 2002; Sanchez-Elsner y col., 2004). En la Figura 41A se muestra un esquema del promotor de ACVRL1 con la localización de los cuatro HRE teóricos mencionados, así como del Smad4. En los paneles 41B y 41C se muestran dos EMSAs efectuados con extractos de células COS-7 sometidas a tratamiento con CoCl<sub>2</sub> (el catión Co<sup>2+</sup> desplaza al Fe<sup>2+</sup> del centro activo de las prolin-hidroxilasas, inhibiéndolas y evitando la degradación de HIF-1 $\alpha$ ) y con dos de las sondas mencionadas: HRE1 y HRE3+Smad4. En el caso del sitio HRE1 (Figura 41B) no se observa banda de retardo específica de HIF-1 $\alpha$ , al no haber competición con la sonda fría ni super-retardo

ante la adición de anticuerpo anti-HIF-1 $\alpha$ . No se puede descartar la unión de HIF-1 $\alpha$  a este sitio, pero no se observa la afinidad esperada de HIF-1 $\alpha$  por la sonda. En cambio, en el caso de la sonda conteniendo el sitio HRE3+Smad4 (Figura 41C), se observa una banda de retardo que se compete con la sonda fría, y esta competición desaparece al mutar el sitio HRE3, pero no el sitio Smad4. La adición de anticuerpo anti-HIF-1 $\alpha$  reconoce el complejo creando una banda de super-retardo. Todo ello demuestra que el sitio HRE3 es funcional y capaz de unir HIF-1 $\alpha$ . Además, la adición de anticuerpo anti-Smad4 también reconoció el complejo y provocó la aparición de una banda de super-retardo, lo cual indica que Smad4 está unido a la sonda, pudiendo estar cooperando en la transactivación mediada por HIF-1 $\alpha$ .

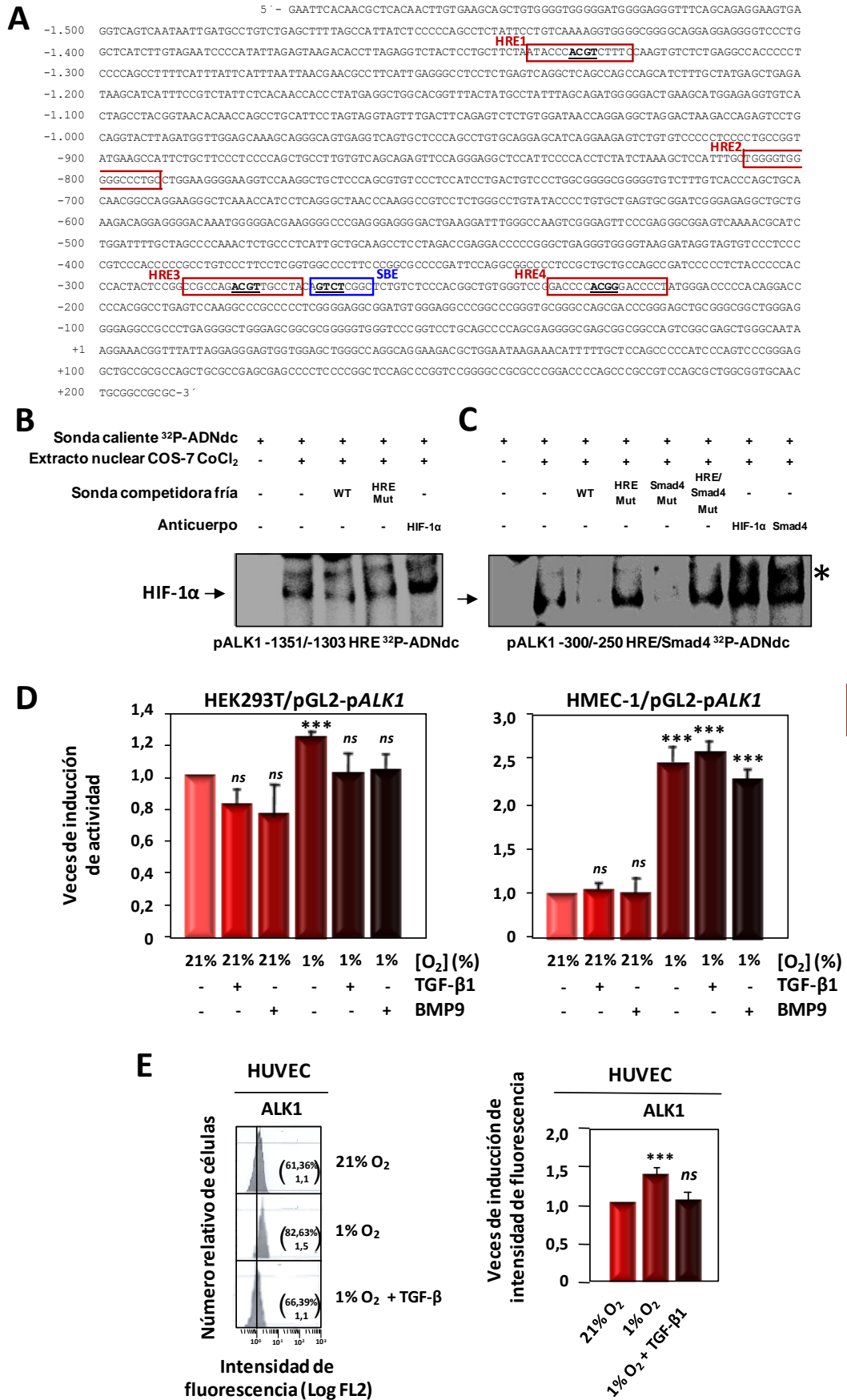
Para estudiar si una transactivación conjunta de Smads y HIF-1 $\alpha$  sobre el promotor de *ACVRL1* tendría alguna consecuencia en la potenciación de la señal, se efectuó un ensayo de transfección transitoria de la construcción pGL2-pALK1 en células HEK293T y HMEC-1 y posteriormente se trataron tanto con TGF- $\beta$ 1, como con BMP9, hipoxia, y combinaciones de la hipoxia con ambos factores de crecimiento (Figura 41D). Como se esperaba, la hipoxia estimuló la actividad del promotor (1,2 veces en HEK293T y 2,4 veces en HMEC-1), pero no se observó ningún cambio significativo, positivo o negativo, tras la adición de TGF- $\beta$ 1 ni BMP9. Como conclusión, *ACVRL1* es un gen diana de HIF-1 $\alpha$ . Ante la hipoxia y, tras la consiguiente estabilización de HIF-1 $\alpha$ , éste se une al promotor de *ACVRL1*, induciendo su transcripción.

Resultados

---

(Página siguiente)

**Figura 41. Identificación de un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) funcional en el promotor de ACVRL1.** **A.** Esquema del promotor de *ACVRL1* y localización de cuatro sitios de respuesta a hipoxia, que se han denominado HRE1, HRE2, HRE3 y HRE4. Hay un sitio SBE (*Smad Binding Element*) adyacente al sitio HRE3. **B.** Ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA) efectuado con una sonda de ADNdc diseñada en la región 1.351/-1.303 conteniendo el sitio teórico HRE1 (-1.339/-1.325), marcada radiactivamente, y con extracto nuclear de células COS-7 tratadas con CoCl<sub>2</sub>. No hay unión de HIF-1 $\alpha$  al consenso HRE situado en esta zona. **C.** EMSA con una sonda de ADNdc diseñada en la región -300/-250, conteniendo el sitio teórico HRE3 (-288/-271), y un sitio de unión a Smads SBE (-269/-261), marcada radiactivamente, y con extracto nuclear de células COS-7 tratadas con CoCl<sub>2</sub>. El ensayo demuestra la unión de HIF-1 $\alpha$  a la secuencia -300/-250 del pALK1. La mutación del sitio HRE3 impide la unión de HIF-1 $\alpha$ , no así la del SBE. Con anticuerpo anti HIF-1 $\alpha$  se obtiene una banda de super-retardo que demuestra la identidad de la proteína como HIF-1 $\alpha$  (asterisco). Con anticuerpo anti-Smad4 también se obtiene una banda de super-retardo. **D.** Transfección transitoria de la construcción pGL2-pALK1 en células HEK293T (izquierda) y HMEC-1 (derecha) y efecto del cultivo en normoxia e hipoxia, combinado con el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 o BMP9 (1ng/ml, 24 horas), sobre su actividad transcripcional. Se observa el aumento de su actividad en hipoxia, pero la magnitud de dicha inducción no cambia con la combinación de hipoxia/TGF- $\beta$ 1 ni con la de hipoxia/BMP9. **E.** Niveles de ALK1 en membrana de células HUVEC en normoxia, hipoxia, e hipoxia + TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml durante 48 horas), medidos por citometría de flujo. El TGF- $\beta$ 1, a las dosis estudiadas, contrarresta el efecto inductor ejercido por la hipoxia sobre la expresión de ALK1 (\*\*p<0,005; ns = no significativo).



Resultados

**DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

ALK1 es una molécula de expresión predominantemente endotelial. Su papel es esencial para el correcto desarrollo de un endotelio funcional, lo cual se demuestra por la letalidad embrionaria de su mutación en homocigosis (Oh y col., 2000), y por el desarrollo de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo 2 (HHT2), una enfermedad vascular sistémica, en heterocigosis (Johnson y col., 1996). En esta enfermedad, los vasos pierden su anatomía normal y su funcionalidad. En localizaciones concretas del organismo, se originan lesiones debido a la pérdida del lecho capilar en zonas de intercambio gaseoso activo, dando lugar a un crecimiento aberrante de arteriolas y vénulas postcapilares, lo que genera lesiones visibles en piel y mucosas. Estas lesiones en mucosas pueden derivar en sangrados, al estar en contacto con ambientes especiales tales como el medio externo (en el caso de la mucosa nasal) o los enzimas digestivos (en el caso de la mucosa gastrointestinal). Los sangrados aumentan con la edad, son muy frecuentes (sobre todo en la mucosa nasal, donde la frecuencia puede ser diaria), disminuyendo la calidad de vida del individuo, que incluso puede requerir transfusiones. Las lesiones vasculares en los órganos internos, tales como pulmón, cerebro o hígado, que derivan en hemorragias silentes, pueden dar lugar a consecuencias fatales, como hemoptisis, hemorragias masivas, abscesos cerebrales e ictus. Hoy en día, se considera que la etiopatología de la enfermedad a nivel molecular es la haploinsuficiencia de ALK1. Es decir, la proteína ALK1 codificada por el alelo mutado no se expresa o no es funcional, y la codificada por el alelo normal resulta insuficiente para ejercer correctamente sus funciones y suplir las necesidades del endotelio. En este contexto, el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de ALK1 cobra una importancia fundamental, siendo crítico el estudio de la regulación transcripcional del gen que codifica ALK1 (*ACVRL1*) para el diseño posterior de estrategias que induzcan la expresión del alelo normal del gen en los individuos HHT2. Asimismo, el estudio de la regulación transcripcional de la expresión de *ACVRL1* ante estímulos fisiopatológicos directamente relacionados con la angiogénesis, como son el daño vascular y la hipoxia, es esencial para desentrañar las causas de la aparición de las malformaciones arteriovenosas localizadas específicamente en determinadas zonas de la vasculatura.

Discusión

## 1 Caracterización de la región promotora del gen *ACVRL1* y estudio de su regulación por Sp1

---

La caracterización de la región promotora del gen *ACVRL1* ha permitido identificar, en este trabajo, dos nuevos transcritos no descritos hasta la fecha. La posibilidad de iniciar la transcripción en distintos sitios a lo largo del promotor sugiere la posible existencia de un fino nivel de regulación de la expresión de ALK1, probablemente dependiente del tipo celular, del momento del desarrollo, o de los requerimientos específicos de la célula en una determinada situación. Esta característica es común entre genes que carecen de consensos generales para el inicio de transcripción en sus promotores.

Los nuevos transcritos descubiertos en el trabajo de esta tesis (ARNm 3 y ARNm 4) contienen un nuevo exón que no existía en los transcritos ya conocidos (ARNm 1 y ARNm 2), y su transcripción comienza alrededor de 500 pares de bases antes que la transcripción iniciada en el +1 (correspondiente al ARNm 1 previamente descrito, y que parece ser el mayoritario). En todos los casos (ARNm 1, 2, 3 y 4), el codón ATG de inicio de traducción es el mismo, y está en el marco de lectura, por lo que la traducción de todas las isoformas de ARNm resulta en una misma proteína de 503 aminoácidos. No obstante, se puede postular que, existiendo dos exones cuya transcripción es alternativa (exón 1 y exón 2), estas secuencias pueden servir para unir diferencialmente factores moduladores del procesamiento del ARNm, así como factores cooperadores para el inicio de la traducción. Su existencia, por lo tanto, resalta la importancia de los mecanismos de regulación postranscripcional en la expresión de ALK1. Además, la comparación de las secuencias de los tres inicios de transcripción (TSS) del gen *ACVRL1* humano (-510, -470 y +1), halladas en células endoteliales HUVEC durante el desarrollo de esta tesis, con las secuencias de genes ortólogos en otras especies de mamíferos, revela el alto grado de conservación que existe entre ellas. Este hecho es especialmente evidente en el caso de los primates, donde también existe un exón que posteriormente no es traducido. Estas regiones pertenecientes al 5'-UTR (región no codificante o *untranslated region*), que se conservan tras el primer procesamiento del pre-ARNm, y que no son eliminadas en el procesamiento alternativo, serán posiblemente reconocidas por proteínas de unión a ARN (RBPs) que regularían tanto dicho procesamiento alternativo, como el transporte del ARNm, su estabilidad, localización y traducción, en cooperación con otros factores de transcripción, con la maquinaria basal, y con el ribosoma. Por todo ello, estas regiones exónicas fueron incluidas en el clonaje de la región promotora del gen *ACVRL1*, para el estudio transcripcional del mismo, llevado a cabo en esta tesis.

Discusión



El análisis de la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1*, utilizando construcciones con secuencias del promotor delecionadas gradualmente por su extremo 5', ha servido para evaluar la importancia de cada región, según la posible existencia de elementos reguladores en la correspondiente secuencia. Concretamente, la construcción más pequeña (-284/+59) muestra una actividad transcripcional similar a la que presenta el fragmento -898/+59. Esto subraya la importancia de la región -284/+59 en la actividad transcripcional global, y sugiere la existencia, en esta zona, de sitios de unión a factores de transcripción críticos para activar la transcripción del gen. El análisis *in silico* del promotor de *ACVRL1* revela que posee numerosos consensos teóricos de unión a factores de transcripción, la mayoría de los cuales (HIF-1 $\alpha$ , Smad, Ets, Sp1, KLF6) también se localizan en el promotor de *ENG* (Botella y col., 2002; Rius y col., 1998). Este hecho apunta hacia un posible mecanismo de regulación compartida entre *ENG* y *ACVRL1*, lo que sería lógico teniendo en cuenta que estos dos genes están involucrados en la misma ruta de señalización. Un dato llamativo es que, pese a la presencia de un sitio Smad en la posición -269/-262, la región -1.035/+210 no responde transcripcionalmente al estímulo mediado por ninguno de los dos ligandos fisiológicos de ALK1, TGF- $\beta$ 1 y BMP9, en las dosis y tiempos estudiados (1 ng/ml TGF- $\beta$  y 0,5 ng/ml de BMP9, durante 3 horas) (Figura 19). Esto puede ser debido a la necesidad de cooperación con otros factores coactivadores que sean reclutados al complejo R-Smad/Smad4 del promotor. Sin embargo, es interesante el hecho de que a largo plazo sí se observa un aumento en el número de transcritos de *ACVRL1* en respuesta a dichos ligandos (Figura 30). Esta observación apoyaría la hipótesis de la existencia de un mecanismo en el que otros factores de transcripción coactivadores cooperan con la ruta TGF- $\beta$ 1-ALK1-Smads, y por lo tanto, que el tiempo necesario para observar la cooperación sea más largo.

El promotor de *ACVRL1* no posee cajas generales de inicio de transcripción TATA/CAAT, mientras que la principal característica que se desprende del análisis *in silico* es la elevada presencia de sitios de unión de Sp1. Sp1 es un factor de transcripción involucrado en los mecanismos basales de inicio de transcripción de numerosos genes carentes de cajas TATA/CAAT. Esta carencia es una característica compartida por los promotores de numerosos genes constitutivos, pero también lo es entre varios receptores de TGF- $\beta$  como son *ENG* y *TGFBRI*, cuya transcripción está dirigida en ambos casos por Sp1 (Botella y col., 2001; Rius y col., 1998). La mayoría de los sitios Sp1 hallados en el promotor de *ACVRL1* están muy conservados entre especies, lo que apoyaría su importancia funcional.

En esta tesis, se demuestra que Sp1 es el factor clave para la activación basal de la transcripción de *ACVRL1*. El promotor no tiene actividad transcripcional ni en células carentes de expresión endógena de Sp1 (Schneider S2), ni en células que normalmente sí lo expresan,

pero cuya expresión está interferida con siARN. Concentraciones bajas de Sp1 consiguen saturar la actividad del promotor, lo cual sugiere una gran dependencia entre la presencia de Sp1 y el inicio de la transcripción. La unión de Sp1 al promotor de *ACVRL1* *in vivo* se demostró mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en células endoteliales sin immortalizar, en cultivo primario, donde se observó la unión de Sp1 a lo largo de toda la secuencia estudiada del promotor. Esta alta frecuencia de unión al promotor en todas las regiones demuestra que Sp1 es esencial para el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción, probablemente mediante interacción directa con ella, tanto por cercanía, al encontrarse Sp1 en los sitios adyacentes a los distintos TSS, como por medio de la formación de lazos de ADN desde elementos algo más distantes. Tal como se muestra en los ensayos de cotransfección transitoria del vector de expresión de Sp1 y de las construcciones seriadas del promotor de *ACVRL1* en células Schneider, la región -284/+59 parece tener elementos Sp1 críticos para la transcripción, al conservar casi la misma actividad que la construcción completa (Figura 20B). Por ello, se ensayó *in vitro* la unión de Sp1 en los sitios localizados en dicha región, mediante ensayos de movilidad electroforética retardada. Así, se caracterizó la existencia de dos sitios funcionales de unión a Sp1, en las posiciones -84/-78 y -67/-62.

Sp1 es clave para la transcripción de numerosos genes que carecen de cajas de inicio de transcripción (TATA/CAAT). En su mayoría, estos genes se expresan en todos los tipos celulares (los llamados genes *housekeeping*), ya que codifican proteínas estructurales o con función metabólica. En cambio, ALK1 es una proteína no constitutiva, sino específica de tejido, cuya expresión está prácticamente restringida al endotelio. Se induce durante la arterialización en el desarrollo, y durante el remodelado arterial atendiendo al flujo hemodinámico. Además, su expresión es mayor en arteriolas y vénulas distales con respecto a arterias y venas más grandes, indicando una preferente expresión en zonas de angiogénesis (Mahmoud y col., 2009; Seki y col., 2003).

Discusión

Siendo ALK1 una proteína específica de tejido, y de expresión inducible ante el estímulo angiogénico, el hecho de que el mecanismo de transcripción basal del gen que codifica ALK1 (*ACVRL1*) esté mediado por Sp1, que es un mecanismo general, implica que:

1) Ante el estímulo angiogénico, la transcripción de *ACVRL1* ha de estar regulada por coactivadores que, según la situación celular y los requerimientos, induzcan la activación del promotor de *ACVRL1* orquestada por Sp1. Por lo tanto, en respuesta a las necesidades fisiológicas, Sp1 cooperaría con otros factores de transcripción para potenciar la expresión de ALK1, favoreciendo así la angiogénesis. Dos de estos coactivadores se han estudiado en esta tesis: KLF6 y HIF-1 $\alpha$ .

2) En cuanto a la especificidad de tipo celular, si la transcripción de ALK1 se debe a la unión de Sp1 en las cercanías de sus TSS y a la cooperación con la maquinaria transcripcional basal, su expresión ocurriría por igual en todos los tipos celulares. En cambio, la expresión de ALK1 está altamente restringida al endotelio, donde son imprescindibles sus funciones específicas en contraposición a las creadas por el receptor tipo I general de TGF- $\beta$  (ALK5), cuya expresión es más ubicua. La explicación para este patrón de expresión tan específico puede residir, además de en la posible intervención de factores específicos que interactúen con Sp1 y con el promotor de *ACVRL1* en endotelio, en las modificaciones epigenéticas del ADN en la región del promotor de *ACVRL1*, que podrían afectar a la unión de Sp1 a los distintos TSS según el tejido.

Los sitios de unión de Sp1 en el ADN son sitios ricos en G+C. Un factor clave que modula la unión de Sp1 a sus sitios de respuesta en el ADN genómico es el grado de metilación de los dinucleótidos 5'-CG-3' de sus elementos consenso. Estos dinucleótidos están agrupados en ciertas regiones del genoma formando las denominadas islas CpG. Sólo un 0,1% del genoma humano aloja islas CpG, que son la única diana de las metiltransferasas de ADN, y contribuyen de un modo crítico a la regulación de la expresión génica. La metilación del ADN se descubrió en 1948 (Hotchkiss, 1948). Después, se supo que las islas CpG metiladas se encuentran en el extremo 5'-terminal de los genes no transcritos, mientras que los genes activos transcripcionalmente no están metilados. La primera y más fuerte asociación de la metilación de islas CpG con implicación funcional se hizo con respecto al cáncer. La hipermetilación de citosinas está relacionada con la inactivación de genes supresores de tumores y de genes reparadores de la replicación del ADN. También la hipometilación puede ser patológica por activación de oncogenes, de retrotransposones o por generación de inestabilidad cromosómica. Todo ello conlleva a la progresión del cáncer y de otras patologías (Esteller, 2007; Garinis y col., 2002; Wu y col., 2010). Hasta ahora, todos los estudios sobre la metilación de citosinas estaban relacionados con la desregulación de expresión génica y su implicación patológica. Pero, además de controlar las tasas de transcripción de genes supresores de tumores y de oncogenes en unos estrechos márgenes, cada vez son más los estudios que asocian la metilación del ADN con la especificidad de expresión de ciertos genes en ciertos tejidos o tipos celulares (Butta y col., 2006; Cao y col., 2000; Doi y col., 2009). Hoy en día, se considera que los patrones de metilación del ADN de un determinado gen son específicos de dicho gen y además varían según el tejido. Esto explicaría como un genoma idéntico se manifiesta de tan diversa manera en los organismos multicelulares.

Varios trabajos muestran que la unión de Sp1 a sus sitios de respuesta, en determinados promotores, previene la metilación del ADN en las citosinas de dichos sitios consenso

(Brandeis y col., 1994; Macleod y col., 1994). Además, se ha demostrado que la metilación <sup>m</sup>CpG puede inhibir la unión de Sp1 a sus sitios de reconocimiento (Clark y col., 1997). Por lo tanto, existen datos que relacionan la metilación de las citosinas de los consensos Sp1 y su capacidad de unión en algunos casos. Los análisis de la secuencia del promotor de *ACVRL1*, elaborados con el programa de predicción CpGplot, indicaron la presencia de dos islas CpG en las proximidades del inicio de transcripción, una entre las posiciones -408/-239 y la otra entre las posiciones -177/+28. La mayoría de los sitios Sp1 del promotor se sitúan en alguna de estas dos islas. Por este motivo, se decidió analizar la capacidad de unión de Sp1 a los elementos de respuesta en el promotor de *ACVRL1* según el estado de metilación de los mismos. Se hicieron ensayos de movilidad electroforética retardada con el fragmento -89/-56, que contiene los dos sitios de unión a Sp1 caracterizados, y se comprobó que la metilación inactiva la unión de Sp1 a ambos sitios ya que la sonda metilada no era capaz de competir la unión de Sp1 a la sonda marcada. Por lo tanto, los sitios consenso Sp1 del promotor de ALK1 requieren estar desmetilados para permitir la unión de Sp1.

Por otra parte, los experimentos llevados a cabo con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) sobre células endoteliales (HMEC-1 y HUVEC) muestran que la desmetilación del ADN conduce al aumento de la expresión de ALK1. Además, los niveles de ARNm de ALK1 en células epiteliales (que no expresan ALK1), tratadas con 5-aza-dC, se incrementan hasta 6 veces, lo cual demuestra que existe un alto grado de metilación del promotor de *ACVRL1* en los tipos celulares donde ALK1 no se expresa. La desmetilación del ADN en la célula endotelial no sólo aumenta los niveles de expresión de *ACVRL1*, sino también los de la diana específica de su ruta de transducción, *ID1*, y del reportero de la ruta de ALK1, p(BRE)<sub>2</sub>-*luc*. Id1 es un efector de parte de las funciones angiogénicas de ALK1, inhibe la diferenciación celular y promueve la proliferación en la primera etapa de activación de la angiogénesis. En este contexto, cabría preguntarse si este aumento en la transcripción de *ID1* se basa bien en una mayor activación de la ruta mediada por ALK1, o bien en que la actividad del promotor de *ID1* también se modifica por la metilación. Para contestar esta pregunta, se hicieron ensayos de metilación *in vitro* sobre la construcción que contiene el promotor de *ID1* (pGL2-p*ID1*), y se analizó la influencia del grado de metilación de dicho promotor en la expresión del gen *ID1*. El resultado mostró que, en la célula endotelial, la metilación total del promotor de *ID1* reduce su expresión al 30%, mientras que, al metilar el promotor de *ACVRL1* *in vitro*, la expresión de ALK1 queda totalmente abolida. Esto indicaría que el grado de metilación del promotor de *ID1* también influye en su expresión, pero que su transcripción no depende de modo tan crítico de ella, como en el caso de ALK1. Por tanto, se puede afirmar que el aumento de la expresión de *ID1* como resultado de la desmetilación del ADN es un

reflejo, al menos en parte, del aumento de expresión de su proteína activadora, ALK1. Como conclusión, el grado de metilación del promotor de *ACVRL1* es esencial para su transcripción, y además influye en la activación de la ruta TGF- $\beta$ /ALK1, tal como se demuestra por el aumento de expresión de Id1 y por la activación de p(BRE)<sub>2</sub>-*luc*.

La 5-aza-dC (decitabina, Vidaza®) es un fármaco utilizado actualmente en la terapia de varios tipos de cáncer, donde existe hipermetilación en promotores de genes supresores de tumores. Teniendo en cuenta que la HHT2 es una enfermedad producida por la insuficiente producción de ALK1, la búsqueda de terapias con fármacos capaces de aumentar la transcripción del alelo no mutado, es una de las facetas prioritarias en la investigación de la HHT2, para paliar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes de HHT2. Hoy en día, existen algunos fármacos que están siendo utilizados en HHT y que aumentan la expresión de ALK1 (ácido tranexámico, raloxifeno) (Albiñana y col., 2010; Fernandez y col., 2007). Estos datos aportan una base para considerar el estudio de la decitabina como posible terapia en HHT2, sin olvidar que la decitabina puede alterar la expresión de protooncogenes capaces de malignizar la célula, por lo que la terapia tendría que ir encaminada de un modo localizado a la célula endotelial y con aplicación local en la lesión vascular.

## 2 Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al daño endotelial

En el año 2003, Seki y colaboradores observaron que ALK1 aumenta su expresión durante la remodelado vascular (Seki y col., 2003), si bien aún se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes a esta inducción. En el segundo objetivo de la tesis, se demuestra que el daño al endotelio es un estímulo clave en la inducción de ALK1 durante el proceso de remodelado vascular. Además, se ha identificado KLF6 como un mediador molecular de dicho estímulo, a nivel transcripcional.

Discusión

La expresión de ALK1 aumenta de manera sustancial en la membrana de las células endoteliales que han sufrido algún daño, tal como hemos demostrado en modelos de daño vascular tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vivo*, la denudación de la túnica íntima de la arteria femoral de ratón muestra un aumento claro en la expresión de ALK1 en el nuevo endotelio formado, comparado con el endotelio de la arteria femoral control. *In vitro*, la denudación de monocapas de células endoteliales HUVEC da lugar a un aumento de expresión de ALK1 en la membrana a partir de 2-3 horas del comienzo de la reparación de la herida. Existe una relación temporal entre la inducción de la expresión de proteína ALK1 en membrana y la translocación de KLF6 al núcleo, indicando la existencia de un mecanismo de regulación entre ambos

eventos. Además, el aumento de proteína ALK1 en membrana va acompañado de un aumento en el número de transcritos de ALK1 en las células que se encuentran en proceso de reparación de la herida, lo cual indica que la inducción de la expresión de ALK1 tras el daño se debe a un mecanismo de regulación transcripcional.

KLF6 es un factor de transcripción asociado a reparación tisular. Aunque es un factor ubicuo, su expresión es elevada en las células esteladas hepáticas, en los hepatocitos, y en las células endoteliales (Atkins y Jain, 2007). KLF6 se induce durante eventos normales de proliferación y diferenciación, como el desarrollo y la regeneración tisular, mientras que la desregulación de su expresión está asociada con la formación de tumores y la aparición de fibrosis hepática (DiFeo y col., 2006; Lalazar y col., 1997; Narla y col., 2005; Ratzu y col., 1998). Además, KLF6 regula la expresión de diversos genes relacionados con la biología endotelial y específicamente con la ruta del TGF- $\beta$ . En las células endoteliales, KLF6 activa al factor uPA (*urokinase plasminogen activator*), activando el TGF- $\beta$ 1 latente (Kojima y col., 2000). El factor uPA es un factor enzimático implicado en la remodelado tisular, entre otras funciones (Werb, 1997). En respuesta al daño vascular, KLF6 transactiva cooperativamente con Sp1 el promotor de *ENG* (Botella y col., 2002). De este modo, tras daño vascular, endoglina se induce, ejerciendo sus funciones en la remodelado de los vasos. Otros genes regulados por KLF6 en respuesta a daño son: TGF- $\beta$ 1, ALK5, T $\beta$ RII (Kim y col., 1998), y el colágeno 1A (Ratzu y col., 1998); todos ellos relacionados con la homeostasis del endotelio. Por último, KLF6 influye sobre la motilidad endotelial formando un complejo represor transcripcional con el factor Sp2 en el promotor de la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-9 (Das y col., 2006). La activación de MMP-9 resulta en la inducción de la migración endotelial, controlando el proceso de remodelado vascular. Por lo tanto, el balance de las funciones activadoras y represoras de KLF6 es esencial para que se lleve a cabo correctamente el proceso de remodelado tisular tras el daño, y para la consecución de una angiogenesis eficaz.

Discusión

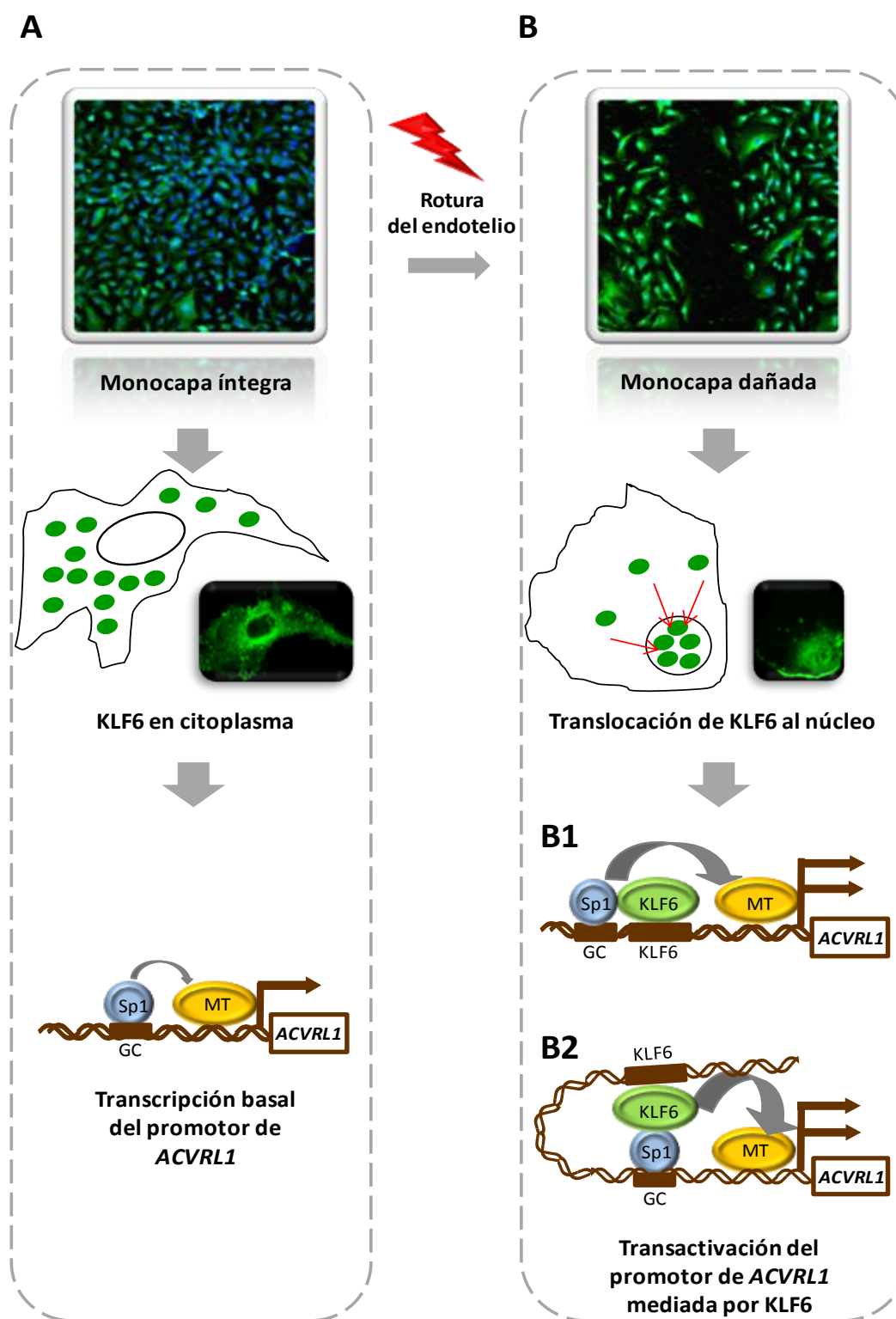
El análisis del promotor de *ACVRL1* revela la presencia de seis sitios de unión a KLF6 teóricos en la región -1,035/+210, indicativos de que la expresión de ALK1 está posiblemente regulada por dicho factor. El silenciamiento de la expresión de KLF6 en células endoteliales *in vitro* tiene como consecuencia la regulación a la baja de los niveles de ARNm de ALK1. Además, *in vivo*, los niveles de ARNm de *Acvrl1* y de proteína Alk1, en estructuras vasculares hepáticas de ratones *Klf6*<sup>+/-</sup> heterocigotos, son claramente inferiores a los que existen en sus compañeros de camada *Klf6*<sup>+/+</sup>. Por lo tanto para su expresión normal, ALK1 requiere de la presencia de KLF6. Asimismo, la sobreexpresión de KLF6 resulta en un aumento de la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1* de entre 13 y 16 veces. Los ensayos de sobreexpresión de KLF6 muestran una clara transactivación de todas las construcciones del pALK1 y, además,

esta inducción es proporcional al número de sitios presentes en cada construcción. Finalmente, los estudios de inmunoprecipitación de cromatina en las regiones -872/-670 y -208/+38, que contienen cinco de los seis sitios KLF6 teóricos, demuestran la unión de KLF6 a ambas regiones del promotor de *ACVRL1* en la célula endotelial. Teniendo en cuenta que los inicios de transcripción (TSS) en células HUVEC corresponden a las posiciones -510, -470 y +1, se deduce que no sólo los sitios KLF6 cercanos a los TSS son funcionales, sino que los que están algo alejados también cooperan en el mecanismo transcripcional, por lo que el ADN adoptaría una conformación en forma de lazo para poner en contacto a KLF6 con el complejo de inicio de transcripción (Figura 42). Además, los experimentos de ChIP se efectuaron tanto con las células HUVEC procedentes de la monocapa intacta, como después de 3 horas de la denudación de la misma. De esos experimentos se deduce que la unión de KLF6 al promotor de *ACVRL1* sucede ya en condiciones basales en la célula, si bien esta interacción aumenta de modo sustancial tras el daño a la monocapa, debido a la translocación de KLF6 al núcleo.

Sabiendo que KLF6 se une al promotor de *ACVRL1* en situación basal, y que actúa de coactivador cuando se movilizan mayores cantidades de KLF6 hacia el núcleo en respuesta al daño, se analizó el efecto conjunto de KLF6 y Sp1 en la transcripción de ALK1. Los ensayos de sobreexpresión de ambos factores demuestran que existe una cooperación sinérgica entre ellos, en la transactivación de *ACVRL1*. Gracias a ello, ALK1 es capaz de aumentar sus niveles en membrana al doble y las células endoteliales *in vitro* proliferan y migran de un modo más eficiente para cerrar la herida, lo sugiere una intensificación en las funciones fisiológicas llevadas a cabo por ALK1.

Considerando todo lo mencionado hasta ahora, se propone el siguiente modelo para el mecanismo de transactivación de *ACVRL1* en respuesta a daño: en situación quiescente, la célula endotelial expresa cantidades abundantes de KLF6 en su citoplasma y región perinuclear, como hemos observado en microscopía de fluorescencia (Figura 28), y mantiene unos niveles de ALK1 en membrana suficientes para responder a las señales circulantes de TGF- $\beta$ /BMP9. Ante la aparición de un daño en la monocapa, KLF6 se transloca con una cinética muy rápida al núcleo, donde se une a los sitios KLF6 consenso hallados en el promotor de *ACVRL1*. Esa unión favorece la interacción entre KLF6 y Sp1, en las proximidades del sitio de inicio de transcripción del gen, ya sea por cercanía o por cambios conformacionales en el ADN que permitan una estructura de lazo, reclutando de un modo mucho más eficiente a la maquinaria general de transcripción y favoreciendo la expresión del gen. En consecuencia, los niveles de ALK1 en membrana aumentan y la célula endotelial responde al estímulo mediante la señalización proliferativa llevada a cabo por ALK1 (Figura 42).



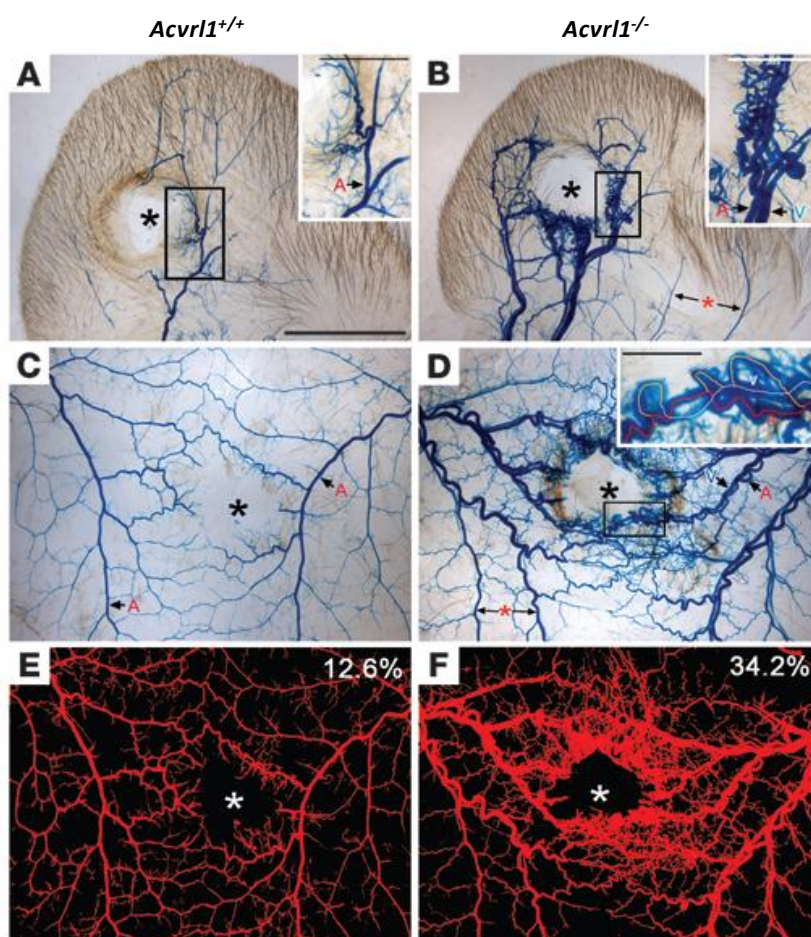


Discusión

**Figura 42. Modelo de transactivación del promotor de *ACVRL1* ejercida por KLF6 en la célula endotelial tras su translocación a núcleo en respuesta al daño.** A. En situación normal, la monocapa endotelial está íntegra y KLF6 se encuentra distribuido por el citoplasma de la célula endotelial. Sp1 se encuentra unido a las cajas GC cercanas a los inicios de transcripción del promotor de *ACVRL1*, donde recluta a la maquinaria de transcripción (MT), a falta de cajas TATA/CAAT. Esa unión activa la transcripción basal de *ACVRL1* manteniendo unos niveles constantes de ALK1 en la membrana. B. Ante la rotura de la monocapa endotelial, KLF6 es movilizado al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta situados en el promotor de *ACVRL1*, cooperando sinérgicamente con Sp1 y potenciando la transcripción de *ACVRL1*. KLF6 puede ejercer sus funciones tanto desde elementos adyacentes al inicio de transcripción (B1) como desde elementos distales (B2).



Se desconoce la causa por la cual las lesiones en los individuos con HHT2 no presentan un patrón regular. Hay grandes diferencias interindividuales en la localización y gravedad de las fístulas, en la aparición y frecuencia de los sangrados y, además, el número de malformaciones arteriovenosas aumenta con la edad (Govani y Shovlin, 2009). Experimentos recientes, utilizando modelos animales en ratón donde la expresión de *ACVRL1* se ha suprimido de modo inducible en el estado adulto, muestran que las lesiones vasculares no se producen en cualquier localización al azar, ni en la misma localización entre individuos. Así, las malformaciones se producen en las zonas en las que un segundo evento (como el daño vascular), se suma al primer evento (la haploinsuficiencia en la cantidad de ALK1 expresada), desencadenando la aparición de la lesión vascular, probablemente por una incorrecta respuesta proliferativa de la célula endotelial (Park y col., 2009) (Figura 43), ante unos niveles de ALK1 muy por debajo de los necesarios para afrontar la situación fisiológica.

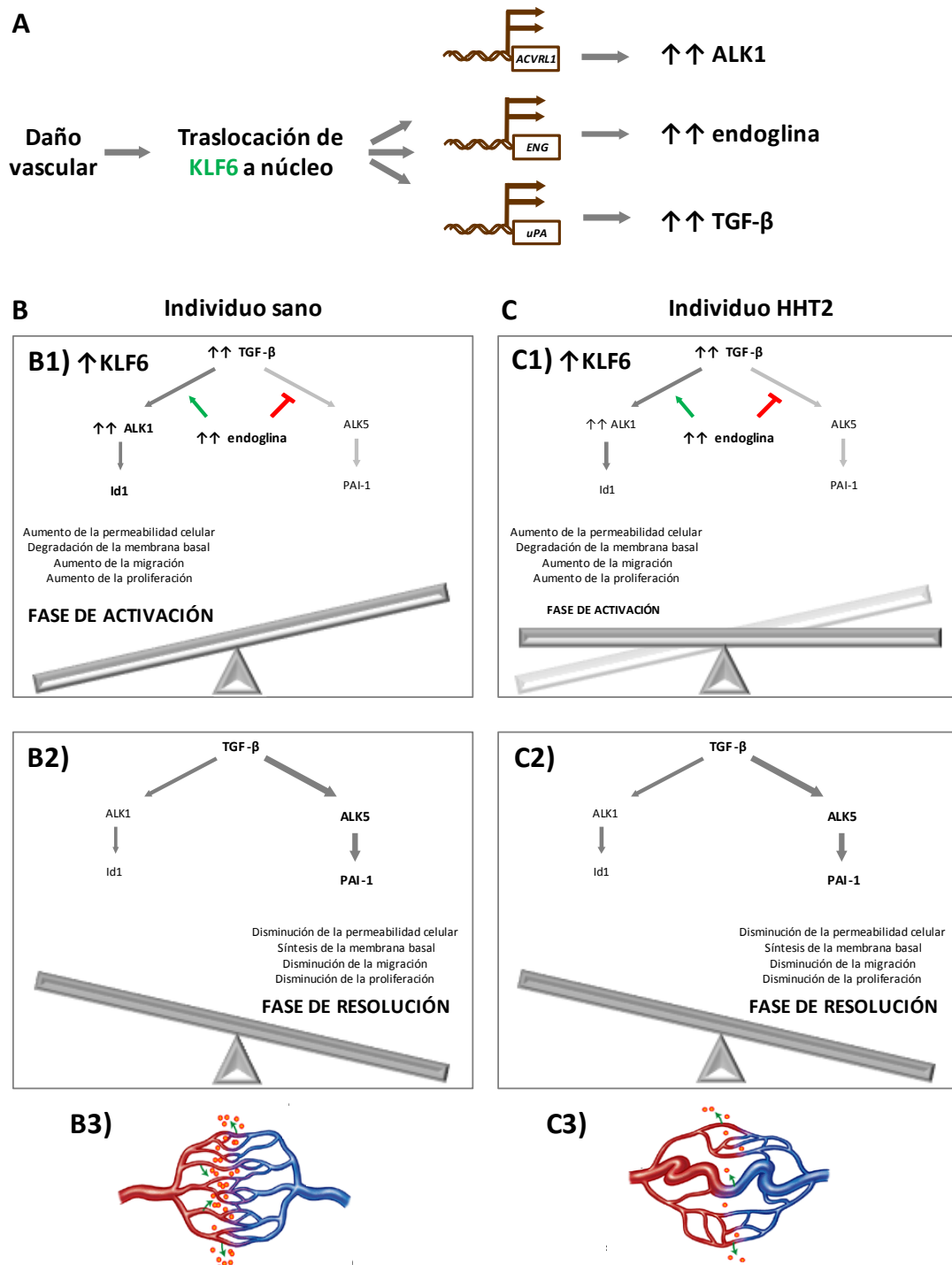


**Figura 43. El daño en la vasculatura induce la formación de malformaciones arteriovenosas *de novo* en los ratones adultos con el gen *Acvrl1* deletado.** Se muestran heridas en la oreja (A y B) y en la piel dorsal (C-F) de ratones control (A, C, y E) y homocigotos *Acvrl1*<sup>-/-</sup> (con el gen *Acvrl1* suprimido de modo inducible) (B, D y F), 8 días tras el daño. Los vasos se muestran con látex líquido coloreado (azul) inyectado en el ventrículo izquierdo de los ratones. El centro de la herida se muestra con un asterisco. Sólo los ratones mutantes *Acvrl1*<sup>-/-</sup> desarrollan uniones directas arteria-vena, como se observa por la aparición de colorante en ambos tipos de vasos (panel B, ampliación superior derecha; A=arteria, V=vena), a diferencia de los controles, donde el colorante solo aparece en las arterias (panel A, ampliación superior derecha; A=arteria). Las malformaciones sólo aparecen en el ratón deficiente en *Acvrl1*, y sólo en los lugares dañados. Tomado de Park y col., 2010.

Los resultados experimentales obtenidos en el segundo objetivo de la tesis han servido para elucidar el mecanismo molecular que une el daño vascular con la ruta de señalización mediada por ALK1, aportando nuevos detalles sobre los eventos fisiológicos que fallan en HHT2 y que pueden ser la causa en determinadas localizaciones de la aparición de malformaciones arteriovenosas. La lesión produce un aumento en los niveles nucleares de KLF6 activo. En un individuo no-HHT2, sin mutación en *ACVRL1*, KLF6 en núcleo estimula la transcripción tanto de *ACVRL1* como de otros genes involucrados en remodelado vascular, como endoglin. Los niveles aumentados de ALK1 y endoglin hacen que se potencie el estímulo promovido por TGF- $\beta$  hacia la fase de proliferación y migración endotelial para reparar la monocapa dañada (señalización mediada por TGF- $\beta$ -ALK1-Smad1/5/8). Se sabe que endoglin favorece la señalización mediada por ALK1 e inhibe la señalización mediada por ALK5 (Bernabeu y col., 2009; Blanco y col., 2005; Lebrin y col., 2004). Una vez finalizada la fase de activación de la angiogénesis, tras producirse la ramificación vascular, la señalización sostenida mediada por TGF- $\beta$  haría que la balanza se inclinara hacia el lado opuesto, parando la proliferación y migración de las células endoteliales, y favoreciendo su diferenciación, así como la formación de la membrana basal, la estabilización de la matriz extracelular, y el recubrimiento del nuevo vaso por pericitos (Goumans y col., 2003; Goumans y col., 2002), mediante la ruta TGF- $\beta$ -ALK5-Smad2/3. De este modo el proceso de angiogénesis finaliza de un modo efectivo, habiéndose creado nuevos vasos, resistentes y funcionales, que surtan de oxígeno y nutrientes a los tejidos que ejercían la demanda tras el daño vascular.

En cambio, en un individuo con mutación en el gen *ACVRL1*, la haploinsuficiencia de ALK1 hace que el efecto transactivador de KLF6 sobre ALK1 sea insuficiente para obtener los niveles de proteína necesarios. Eso causaría la desregulación entre los procesos proliferativos de la ruta TGF- $\beta$ -ALK1 y los procesos mediados por la ruta TGF- $\beta$ -ALK5, encargados de la estabilización del vaso formado. La transactivación del promotor de *ENG* por KLF6 aumentaría la expresión de endoglin en membrana y eso inhibiría la señalización de ALK5, sin estimular suficientemente la de ALK1. Por tanto, en la balanza, la señal de activación de ALK1 sería insuficiente, inclinándose de modo temprano hacia el lado de la señalización mediada por ALK5. En consecuencia, la fase de activación de la angiogénesis no ocurriría con normalidad en HHT2, y con ello, la incipiente red capilar creada en respuesta al daño no llegaría a formar un número suficiente de ramificaciones, mientras que la señalización de ALK5 en la última etapa reclutaría pericitos alrededor de esos vasos incipientes e inmaduros, estabilizándolos cuando la red aún no fuera suficientemente ramificada, ni el diámetro de los vasos fuera el adecuado. De este modo, ocurriría una angiogénesis incorrecta en el lugar de la lesión que daría como resultado el fenotipo característico de las conexiones arteriovenosas en HHT: vasos

ensanchados, aberrantes y anastomosis entre arterias y venas carentes de red capilar. De hecho, las localizaciones donde aparecen las lesiones en HHT son normalmente zonas de agresión ambiental/externa, como la mucosa nasal, o interna (debido a enzimas digestivos o a pH ácido), como el tracto gastrointestinal. Este modelo propuesto se muestra en la Figura 44.



Discusión

(Página anterior)

**Figura 44. Modelo de regulación de la ruta del TGF- $\beta$  por KLF6 e ineficacia del proceso en HHT2, causante del desarrollo de malformaciones arteriovenosas.** **A.** Ante el daño vascular, KLF6 se transloca al núcleo transactivando los promotores de *ACVRL1*, *ENG* y *uPA* (el cual activa el TGF- $\beta$  latente). **B.** En el individuo sano, el aumento de TGF- $\beta$ , sumado al aumento de endoglin y ALK1 en membrana debido a la transactivación de sus promotores ejercida por KLF6, favorece una duradera y eficiente fase de activación de la angiogénesis (B1). Tras la salida de KLF6 al citoplasma de nuevo (B2), bajan los niveles de ALK1 en membrana, y desaparece el efecto inhibidor que endoglin ejerce sobre ALK5. De este modo, se favorece una fase de estabilización del vaso por reclutamiento de pericitos y creación de matriz extracelular. Como resultado, se crean vasos en la zona donde se produjo la lesión, de calibre adecuado y estructura resistente (B3). **C.** En el individuo HHT2 con haploinsuficiencia de ALK1, TGF- $\beta$  y endoglin están aumentados, pero ALK1 no consigue elevar su expresión al nivel necesario para responder al daño (C1). La fase de activación termina sin que los vasos se ramifiquen suficientemente. Cuando los niveles de KLF6 bajan en núcleo y endoglin disminuye, la fase de resolución se da con normalidad (C2). Esto lleva a la resolución de vasos que aún no se habían conectado bien, que son débiles debido a la escasa proliferación de células endoteliales, y fáciles de romper (C3).

### 3 Regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al estímulo hipóxico

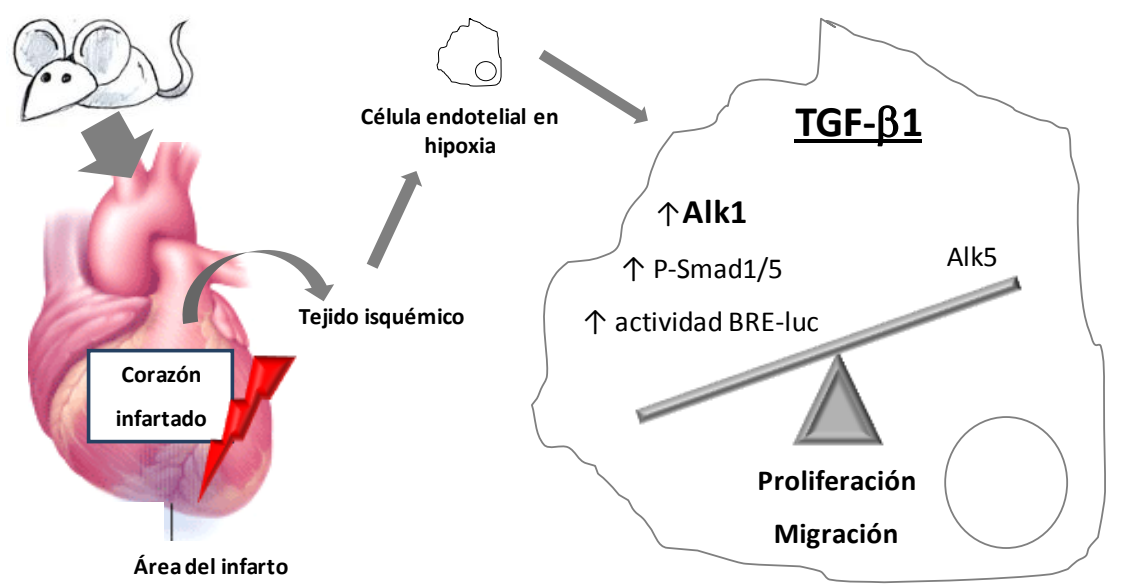
La hipoxia es uno de los estímulos principales que promueven la angiogénesis (Pugh y Ratcliffe, 2003). La baja concentración de oxígeno en el medio es una alerta celular que desencadena numerosas respuestas moleculares con la finalidad de restaurar la homeostasis de los tejidos mediante la rápida aportación de oxígeno a los mismos. Para conseguirlo, se activan diversos procesos a distintos niveles como la hiperventilación, la vasodilatación, la mayor producción de glóbulos rojos y, fundamentalmente, la angiogénesis. La finalidad de la angiogénesis o remodelado vascular es crear nuevos vasos que irrigen: i) zonas que hayan sido dañadas, ii) obstruidas por un émbolo o coágulo, y iii) tejidos de nueva formación, como es el caso del endometrio durante la gestación. También es un mecanismo aprovechado por las células tumorales para asegurar el aporte nutricional y energético que les permita crecer. Esta respuesta ha de ser rápida, está fundamentalmente mediada por HIF-1 $\alpha$ , y son muchos los genes diana de la regulación ejercida por dicho factor que están implicados en angiogénesis: VEGF, endoglin, el colágeno 1 $\alpha$ , angiopoyetina-2, Tie-2, angiopoyetina-1, PDGF, receptor uPA, entre otros (Pugh y Ratcliffe, 2003).

Discusión

ALK1, a su vez, tiene un papel crucial en la angiogénesis, ya que promueve la formación de vasos sanguíneos mediante regulación de genes implicados en proliferación, migración y ramificación (*sprouting*) a través de su ruta de transducción de señales por medio de Smad1/5/8, en respuesta a sus ligandos TGF- $\beta$ 1 y BMP9 (Cunha y col., 2010; Goumans y col., 2002; Seki y col., 2003). Por lo tanto, en el tercer objetivo de la tesis hemos estudiado la respuesta de ALK1 ante la hipoxia celular en la célula endotelial.

Nuestros datos muestran cómo la expresión de ALK1 aumenta notablemente cuando las células endoteliales en cultivo se tratan con desferrioxamina (DFO), un quelante de Fe<sup>2+</sup> que simula la hipoxia mediante la inhibición de la degradación de HIF-1 $\alpha$  por las proli-hidroxilasas.

Este aumento de ALK1 se da tanto en la línea celular HMEC-1, como en los cultivos primarios de HUVEC y BOEC, y también se observa cuando se cultivan las células en una cámara de hipoxia con un 1% de O<sub>2</sub>. En concordancia con los datos obtenidos en estos experimentos, un trabajo de investigación reciente describe un aumento de los niveles de Alk1 en el ventrículo de ratones tras infarto de miocardio, mostrando un aumento al doble de la expresión de Alk1, una semana después del infarto, en la región circundante a la que sufrió la isquemia, (Tian y col., 2010) (Figura 45). Además, ya había indicios de dicha inducción de ALK1 durante procesos isquémicos, ya que, al ligar una rama vascular de segundo orden que riega el íleon, se produce daño isquémico, que va asociado a un aumento en el riego sanguíneo de las arterias aferentes a dicho punto y un claro aumento en la expresión de Alk1 en dichas arterias aferentes de ratón (Seki y col., 2003) .



**Figura 45. ALK1 aumenta su expresión en la célula endotelial de las arterias coronarias que han sufrido isquemia tras infarto de miocardio.** Según los datos de Tian y colaboradores, la hipoxia induce los niveles de Alk1 y de fosfo-Smad 1/5 en el miocardio infartado de ventrículos izquierdos de ratón, comparado con controles (Tian y col., 2010). Este efecto se observa a una semana del infarto y los niveles vuelven a la normalidad tras tres semanas.

Discusión

En concordancia con estos resultados, cuando se analizan los niveles de HIF-1α y ALK1 por *western blot* tras hipoxia, se observa un aumento en paralelo de ambas proteínas (Figura 38). Lo que es más importante, bajo estas condiciones, Smad1, efectora principal de la ruta de ALK1, se encuentra fosforilada. Esto demuestra que la inducción en la expresión de ALK1 debida a la hipoxia repercute también en la activación de su cascada de señalización. Estos resultados están apoyados por los datos de Tian y colaboradores, en los cuales la cotransfección del vector de expresión de una isoforma constitutivamente activa de ALK1 y del vector reportero específico de la cascada de señalización de ALK1, p(BRE)<sub>2</sub>-luc, resulta en un notable aumento de la actividad de dicho reportero p(BRE)<sub>2</sub>-luc, al ser sometida la célula

endotelial a condiciones de hipoxia. Lo que es aún más significativo, el incremento en los niveles de Alk1 que observan en el ventrículo infartado de ratón, se refleja en un aumento en los niveles de fosfo-Smad1 (Tian y col., 2010). Por lo tanto, queda claro que, ante la falta de oxígeno, los niveles de ALK1 aumentan en la célula endotelial y que la cascada de señalización TGF- $\beta$ /ALK1/Smad1-5-8 está activada. ¿Cuál es el mecanismo molecular responsable de dicho aumento de ALK1 y de la activación de la ruta? Una gran parte de las funciones celulares de respuesta ante situaciones de hipoxia están mediadas por HIF-1 $\alpha$ . Sin embargo, también hay otros mecanismos moleculares regulados en respuesta a hipoxia que son independientes de HIF-1 $\alpha$  (Arany y col., 2008; Arsham y col., 2003; Nakayama, 2009). En este trabajo hemos observado que, ante el silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$ , la inducción de la expresión de proteína ALK1 en respuesta a hipoxia desaparece (Figura 37). Esta observación relaciona directamente la inducción de ALK1 en respuesta a hipoxia con la presencia de HIF-1 $\alpha$ .

El aumento de ALK1 en membrana corresponde a un aumento en los niveles de su ARNm, indicando que la inducción de ALK1 está ocurriendo a nivel transcripcional (Figura 39). Además, merece la pena destacar que tras la hipoxia hay, paralelamente al aumento de ARNm de las dianas transcripcionales de HIF-1 $\alpha$ , un aumento en los niveles de ARNm del propio HIF-1 $\alpha$ , lo que sugiere la existencia de un mecanismo de autorregulación transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , de inducción en respuesta a hipoxia. Este resultado es interesante, aunque se sabe que el principal mecanismo de regulación de su expresión ocurre a nivel de degradación de su proteína. En relación con ALK1, el aumento en el número de transcritos en hipoxia, junto con la anulación de su inducción en hipoxia al silenciar HIF-1 $\alpha$  (vista anteriormente), refuerza la hipótesis de que HIF-1 $\alpha$  está implicado en un mecanismo de regulación transcripcional de *ACVRL1*. Para confirmarlo, se realizaron experimentos de sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  y de hipoxia sobre la actividad transcripcional del promotor. El resultado fue que la actividad transcripcional del promotor de *ACVRL1* aumenta fuertemente en respuesta a: i) la hipoxia; y ii) la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ . Por el contrario, su actividad ante la sobreexpresión de la forma dominante negativa de HIF-1 $\alpha$  se anula por completo. Estos experimentos son determinantes para demostrar que la relación observada entre la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y el aumento de ALK1 se debe a un efecto directo de regulación entre ambos factores, y localizan el mecanismo de regulación en la región del promotor de *ACVRL1* sometida a estudio.

No se puede descartar que *ACVRL1* pueda ser regulado también por otros miembros de la familia HIF similares a HIF-1 $\alpha$ . Se sabe que HIF-2 $\alpha$  a menudo tiene funciones redundantes con las de HIF-1 $\alpha$  y que se expresa predominantemente en la célula endotelial, aunque también en riñón, pulmón, corazón e intestino delgado (Gordan y col., 2007; Loboda y col., 2010). De hecho, la observación de los altos niveles de expresión de ARNm de HIF-2 $\alpha$  en células



endoteliales y tejidos altamente vascularizados, fue la causa por la que se le asignó inicialmente el nombre EPAS-1 (*endothelial PAS domain protein-1*) (Tian y col., 1997). La hipótesis de que esta subunidad está predominantemente implicada en la adaptación de la vasculatura ante la hipoxia está apoyada por la observación de que HIF-2 $\alpha$  transactiva el promotor de VEGF en un modo aparentemente más potente que HIF-1 $\alpha$  (Akeno y col., 2001; Ema y col., 1997). Además, la sobreexpresión de HIF-2 $\alpha$ , y no de HIF-1 $\alpha$ , potencia la expresión del receptor tirosin-quinasa endotelial Tie2 (Tian y col., 1997). Por ello, se ensayó el efecto de la sobreexpresión de HIF-2 $\alpha$  sobre la transcripción de la región promotora -1.035/+210 de *ACVRL1*. Este experimento nos sirvió para determinar que el efecto mediado por HIF-1 $\alpha$  sobre el promotor de *ACVRL1* en respuesta a hipoxia es específico de HIF-1 $\alpha$ , ya que HIF-2 $\alpha$  no ejerce ningún tipo de transactivación del promotor (Figura 40C). Una vez centrado el interés en HIF-1 $\alpha$ , se corroboró su papel al silenciar la expresión de HIF-1 $\alpha$  y estudiar la actividad transcripcional del promotor en hipoxia. Bajo estas condiciones en las que HIF-1 $\alpha$  no puede traducir su ARNm a proteína, la activación del promotor de *ACVRL1* en respuesta a hipoxia no tiene lugar.

Tras la demostración de la existencia de un efecto transactivador de HIF-1 $\alpha$  sobre el promotor de *ACVRL1*, el análisis *in silico* del promotor de *ACVRL1* reveló la presencia de cuatro sitios teóricos consenso de unión de HIF-1 $\alpha$ . Mediante experimentos de movilidad electroforética retardada (EMSA) se ha caracterizado un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) funcional situado en la posición -288/-271, correspondiente a la secuencia 5'-CCGCCAGACGTGCCTAC-3'. HIF-1 $\alpha$  se une a este sitio en el promotor de *ACVRL1*, siendo esta unión la responsable, al menos en parte, del efecto de inducción transcripcional de *ACVRL1* en respuesta a la hipoxia. Además, dicho sitio HRE tiene en su extremo 3' un elemento de unión a Smad4. Por ello, se probó la adición de anticuerpo anti-Smad4 sobre el complejo proteico asociado a ese segmento del promotor en los ensayos de EMSA y se observó que producía una banda de super-retardo. En un principio esto parecía indicar un complejo en el que tanto HIF-1 $\alpha$  como Smad4 (dimerizada con alguna R-Smad) estuvieran interaccionando conjuntamente sobre el promotor de *ACVRL1*. Esta posibilidad sugeriría la cooperación entre las señales hipoxia/TGF- $\beta$ , como ya ha sido descrita para otros promotores como es el caso del promotor de *ENG*, donde existe una regulación conjunta de las rutas de HIF-1 $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 mediante cooperación funcional de los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$ /Smad3 (Sanchez-Elsner y col., 2002). En este caso, los datos sólo demostraban la unión de Smad4 a ese elemento de unión existente en 3' al HRE: 5'-CCGCCAGACGTGCCTACAGTCTCGGC-3', en la posición -269/-266. Se decidió estudiar el efecto de los ligandos naturales de la ruta TGF- $\beta$ /ALK1 sobre el promotor de *ACVRL1*, tanto en normoxia como en hipoxia, para ver si existía algún tipo de cooperación. Sin

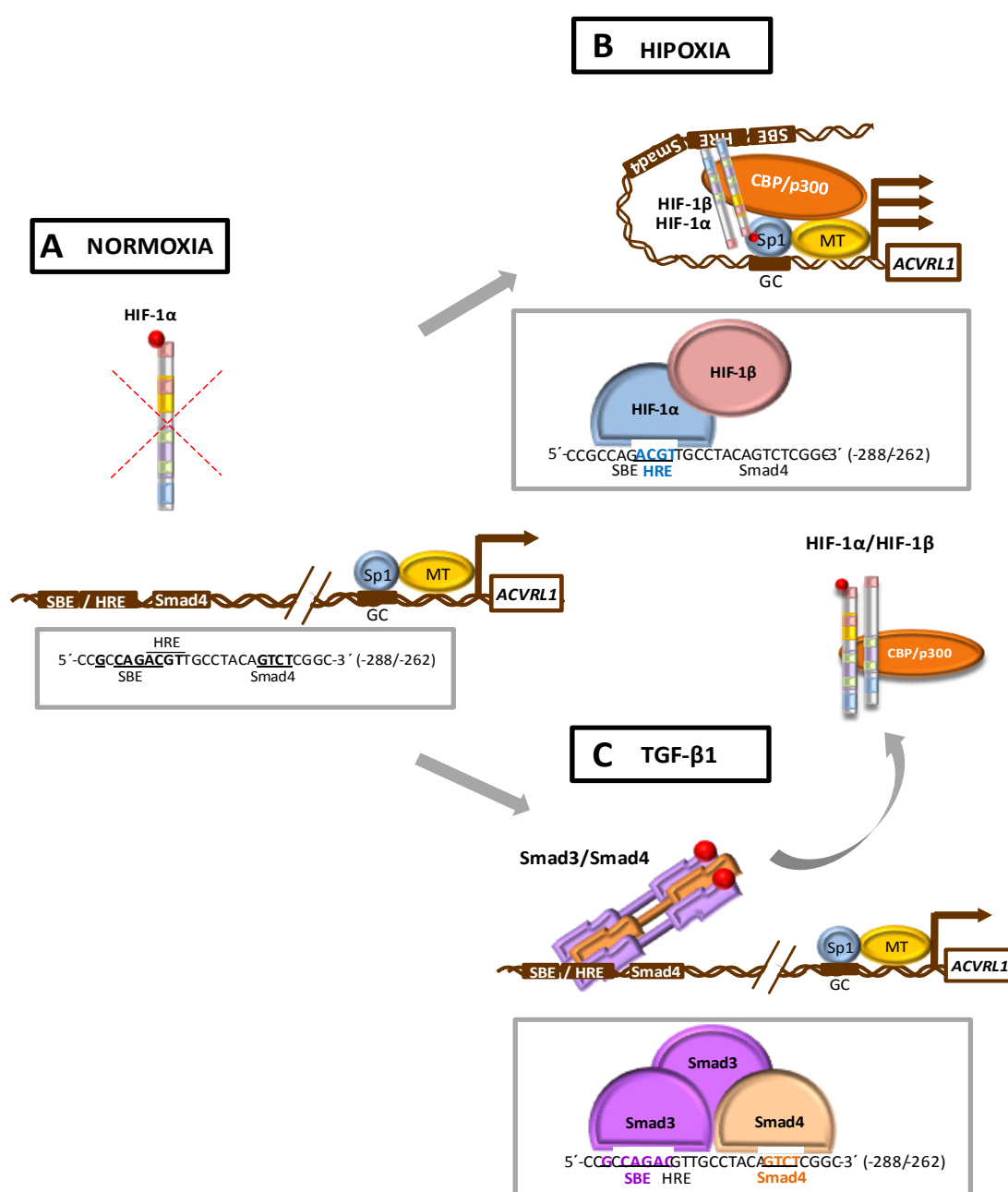
embargo, al estudiar la actividad transcripcional de la construcción del promotor de *ACVRL1* en respuesta a hipoxia y a los ligandos activadores de la ruta Smad mediada por ALK1 (TGF- $\beta$  y BMP9), tanto individualmente como en combinación (hipoxia+TGF- $\beta$  e hipoxia+BMP9), observamos que el efecto activador que la hipoxia ejerce sobre el promotor de *ACVRL1* no se modifica en presencia de ninguno de los dos ligandos (Figura 41D), incluso presenta una ligera disminución. Igualmente, los niveles de proteína ALK1 en membrana tras el tratamiento con TGF- $\beta$  en condiciones hipóxicas son algo menores que los niveles de ALK1 existentes en hipoxia en células sometidas solamente a hipoxia (Figura 41E). Estos resultados no apoyan la posibilidad de una cooperación entre ambos estímulos. Al revisar la secuencia en profundidad, se descubrió un evento que puede ser clave para entender la razón del hallazgo de Smad4 unido a esa región del promotor. Si bien la herramienta MatInspector no lo había detectado (posiblemente por no contar con este consenso en su base de datos), el promotor de *ACVRL1* muestra un consenso 5'-GNCAGACN-3', de unión a Smad3 (Attisano y Wrana, 2000; Shi y col., 1998), solapando con el HRE caracterizado: 5'-CCGCCAGACGTTGCCTACAGTCTCGGC-3'. Este consenso, también llamado SBE (*Smad binding element*), se descubrió por primera vez en el promotor del gen *PAI-1* (*Plasminogen activation inhibitor-1*), gen diana típico de la señalización de la expresión mediada por TGF- $\beta$ -ALK5. De hecho, dio lugar a la construcción de un vector reportero que se usa específicamente para estudiar dicha ruta de señalización, el p(CAGA)<sub>12</sub>-*luc* (Dennler y col., 1998). Por lo tanto, el efecto que podría existir sería una competición entre la señal TGF- $\beta$ -ALK5 y la señal HIF-1 $\alpha$ , sobre el mismo lugar en el promotor, más que un mecanismo de cooperación positiva entre las rutas TGF- $\beta$ -ALK1 y HIF-1 $\alpha$  sobre el promotor de *ACVRL1*. De hecho, las dosis de TGF- $\beta$ 1 empleadas (1 ng/ml) están descritas para la activación de la ruta TGF- $\beta$ -ALK1, mientras que para la activación de la ruta TGF- $\beta$ -ALK5 se consideran necesarias dosis más altas (10 ng/ml) (Goumans y col., 2003). Estas nuevas consideraciones requieren la realización de nuevos experimentos utilizando dosis mayores de TGF- $\beta$ 1 para estudiar si existe o no algún efecto entre Smad3 y HIF-1 $\alpha$ , quizá represor, por competición por su sitio de unión en el promotor de *ACVRL1*. Esta nueva hipótesis de trabajo, que ha surgido a raíz de los últimos resultados de esta tesis, servirá como punto de inflexión para continuar con la investigación llevada a cabo hasta ahora.

Discusión

En resumen, interpretamos que los resultados del EMSA, donde aparece una banda de super-retardo tanto con anti-HIF-1 $\alpha$  como con anti-Smad4 (Figura 41C), se deben a la presencia, por un lado, de complejos HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  sobre el HRE, y por otro, a la presencia de Smad3/Smad4 sobre el SBE. De hecho, la separación entre el sitio SBE de unión a Smad3 y el sitio de unión a Smad4 es de unos 10 pb, lo que se considera una separación adecuada para la unión de ambos factores al ADN en modo dimérico. Descartamos, por el momento, la



existencia de un complejo formado por ambos dímeros de factores sobre el promotor. En este caso, al haberse hecho el EMSA con extractos nucleares de células sometidas a hipoxia, sería mayoritaria la unión de HIF-1 $\alpha$  que la de Smad3/4, si bien se detecta algo de unión a Smad3/4, debido posiblemente a la presencia en el suero bovino fetal de trazas de TGF- $\beta$ 1. De este modo, proponemos un modelo hipotético en el que, dependiendo del estímulo recibido por la célula endotelial, el mecanismo de transcripción de *ACVRL1* estaría inducido por HIF-1 $\alpha$  o modulado de algún modo por la unión de Smad3, que desplazaría a otros factores de su unión cooperativa con la maquinaria de transcripción. Esta hipótesis es meramente especulativa ya que los datos obtenidos hasta la fecha no son suficientemente concluyentes para determinar si la ruta TGF- $\beta$ -ALK5-Smad3 puede estar jugando un papel represor en el promotor de *ACVRL1*.



Discusión

(Página anterior)

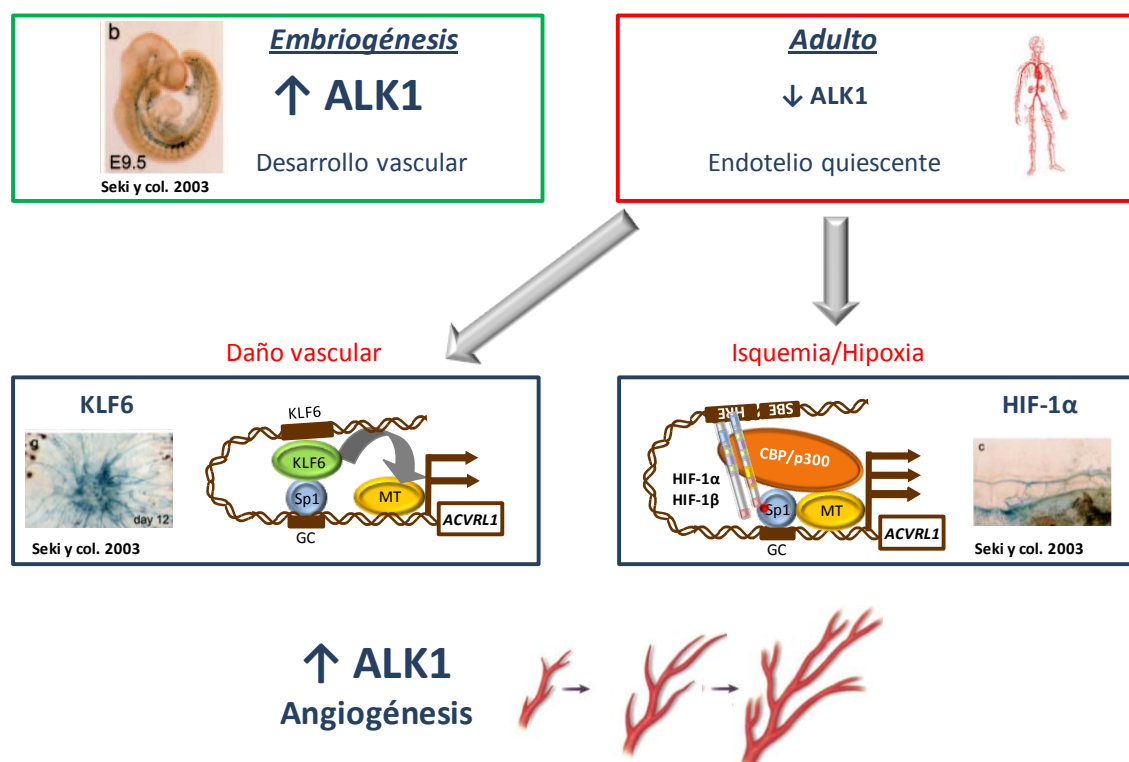
**Figura 46. Modelo de transactivación del promotor de *ACVRL1* en la célula endotelial, mediada por HIF-1 $\alpha$  en situación de hipoxia.** **A.** En normoxia, HIF-1 $\alpha$  está siendo degradado por el proteasoma y el sitio HRE -288/-271 está libre. Hay niveles basales de transcripción del gen debidos a la unión de Sp1 a los sitios GC. **B.** En hipoxia, se inhibe la degradación de HIF-1 $\alpha$ , estabilizándose la proteína, la cual dimeriza con HIF-1 $\beta$  y se une al sitio HRE situado en -288/-271. La unión del complejo HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  recluta al factor CBP/p300 sobre el promotor, induciendo de un modo muy eficaz la transcripción del gen *ACVRL1*. **C.** Cuando el TGF- $\beta$ 1 señala por la ruta mediada por ALK5, se activa la cascada de transducción, y el dímero Smads3+Smad4 se une a los sitios de unión SBE y Smad4. Como el sitio SBE solapa con el HRE, la unión de Smad3 impide la unión de HIF-1 $\alpha$ , evitando el reclutamiento de CBP/p300 sobre el promotor de *ACVRL1*. MT = Maquinaria de transcripción basal.

En este tercer objetivo de la tesis se ha demostrado que *ACVRL1* es un gen diana de HIF-1 $\alpha$ . En respuesta a hipoxia, HIF-1 $\alpha$  deja de degradarse, y se une a un elemento de respuesta presente en la región promotora de *ACVRL1*, potenciando su actividad transcripcional fuertemente. Los resultados obtenidos proporcionan nuevas aproximaciones al mecanismo molecular de actuación de la célula endotelial ante la activación de la angiogénesis en respuesta a hipoxia. En nuestro laboratorio habíamos caracterizado con anterioridad el efecto inductor de HIF-1 $\alpha$  sobre la transcripción de *ENG* (Sanchez-Elsner y col., 2002). El aumento de niveles de ALK1 y endoglina en la membrana de la célula endotelial, mediado por HIF-1 $\alpha$  en respuesta a la hipoxia, es un efecto complementario a la inducción ampliamente conocida de VEGF, mediada por el propio HIF-1 $\alpha$ , y que parece ser el mecanismo fundamental de respuesta angiogénica a la falta de oxígeno (Forsythe y col., 1996; Sanchez-Elsner y col., 2001; Shweiki y col., 1992). La señalización de estas tres proteínas (ALK1, endoglina y VEGF) regula genes involucrados en proliferación y migración de la célula endotelial, cuya expresión se activa en situaciones de necesidad (tras un infarto de miocardio, en remodelado vascular tumoral, etc). El descubrimiento de este mecanismo de regulación transcripcional aporta nuevas dianas potenciales para nuevos fármacos en el tratamiento de las patologías cardiovasculares y de la HHT. De hecho, la desferrioxamina ya se usa desde hace tiempo en clínica, aunque su uso está asociado al efecto quelante del hierro, en patologías asociadas a un exceso del mismo como hemosiderosis, hemocromatosis asociada a algunas anemias crónicas (como la talasemia o el síndrome mielodisplásico), donde los pacientes requieren de constantes transfusiones que pueden incrementar en gran medida su contenido de hierro en sangre. Su vía de administración por vía subcutánea es segura y podría tratarse de un medicamento de interés en la terapia paliativa de HHT, al estimular la producción de HIF-1 $\alpha$  y, por tanto, de ALK1 y endoglina.

Discusión

## 4 Relevancia de los resultados

Hasta ahora, se sabía que la expresión de ALK1 es fundamental durante el desarrollo de la vasculatura en la embriogénesis (Seki y col., 2003). En cambio, la expresión de ALK1 disminuye en gran medida durante la etapa adulta, donde se expresa preferencialmente en arteriolas y vénulas de calibre pequeño y en regiones distales, con respecto a vasos de mayor calibre, como se ha estudiado en el pulmón de ratón (Mahmoud y col., 2009). Este dato puede resultar paradójico a primera vista, ya que los vasos distales del pulmón son los más cercanos al alveolo, donde hay una alta concentración de oxígeno, y cabría pensar que una menor expresión de ALK1 según nuestros resultados donde es la hipoxia la que induce su expresión. Pero hay que tener en cuenta las diferencias entre el estado embrionario y el estado adulto, donde los mecanismos de regulación pueden ser distintos. Estos distintos patrones de expresión se resumen en la Figura 47.

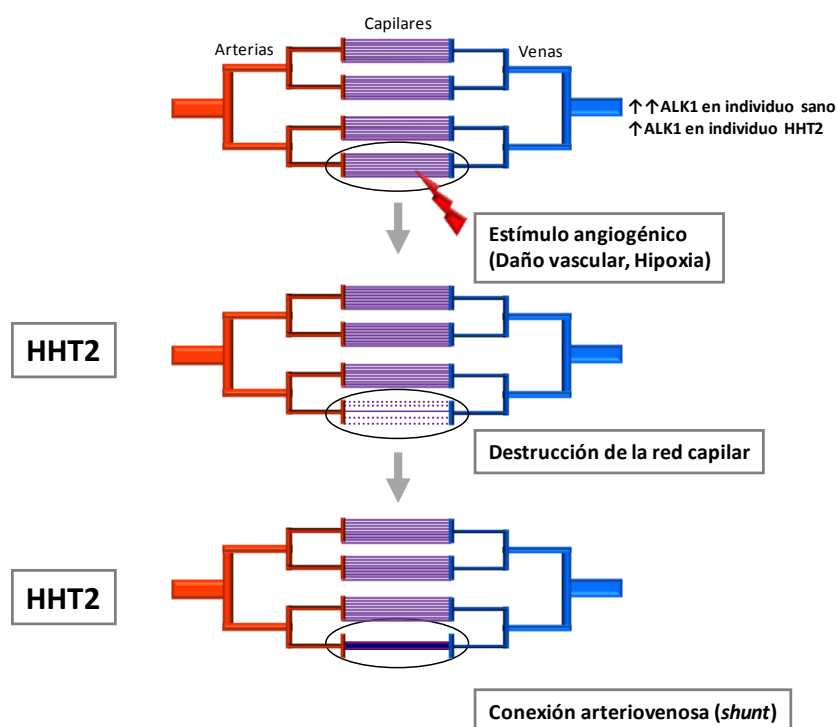


Discusión

**Figura 47. Estímulos de la expresión de ALK1 durante la etapa adulta estudiados en esta tesis y modelos de los eventos moleculares responsables de dicha inducción.** Durante la etapa embrionaria y perinatal, la expresión de ALK1 es muy elevada en la vasculatura, debido al importante papel que ejerce en la vasculogénesis y la angiogénesis en el embrión. En cambio, en la etapa adulta, los niveles de expresión de ALK1 disminuyen notablemente, ya que el endotelio se encuentra, generalmente, en estado quiescente. Ante la necesidad de un remodelado de la red vascular, ALK1 ha de expresarse de nuevo con más intensidad para ejercer sus funciones proliferativas en respuesta a TGF-β. Dos de los casos donde existe dicha necesidad son el daño vascular y la hipoxia. En esta tesis se describe la transactivación ejercida por los factores KLF6 e HIF-1α, sobre el promotor de *ACVRL1*, como mecanismos moleculares subyacentes a estos dos procesos.

El descubrimiento del efecto inductor de la expresión del gen *ACVRL1* por los factores HIF-1α y KLF6 relaciona por primera vez la regulación de la expresión de ALK1 con factores

ambientales. El trabajo de investigación llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis ha servido para describir los mecanismos moleculares subyacentes a dos procesos fisiopatológicos implicados en la regulación de la expresión de ALK1, daño endotelial e hipoxia. Estos dos procesos regulan la expresión del gen *ACVRL1* a nivel transcripcional, para promover la angiogénesis. De este modo, se desvelan dos interrogantes sobre los mecanismos moleculares que pueden ser el recientemente postulado “segundo evento” etiopatogénico de las malformaciones arteriovenosas en HHT2. Según esta hipótesis, en un individuo HHT, la red capilar no se destruye por la haploinsuficiencia de ALK1, sino que es necesaria la presencia de un segundo evento (Shovlin y Oh, 2010). Este segundo evento puede ser una mutación somática, un evento inflamatorio, una agresión que dañe la monocapa endotelial, o una carencia de oxígeno en una determinada zona, como se muestra en la Figura 47. En este sentido, la inducción de *ACVRL1* por KLF6 y HIF-1 $\alpha$  podrá servir como base para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que potencien la expresión endógena de la proteína.



Discusión

**Figura 48. Modelo de desarrollo de malformaciones arteriovenosas en los individuos de HHT2 ante la aparición de un segundo estímulo.** El hecho de que las malformaciones arteriovenosas aparezcan en localizaciones distintas en cada individuo HHT2, sumado al hecho de que son más frecuentes con la edad, sugiere que el desarrollo de dichas malformaciones puede deberse a la aparición de un “segundo evento” (sumado al “primer evento” que sería la haploinsuficiencia de ALK1 debido a la mutación en heterozigosis del gen *ACVRL1*). Este segundo evento podría ser una mutación somática, un evento inflamatorio, una lesión vascular o una bajada en los niveles de oxígeno debido a una isquemia o a otra situación de hipoxia. Como consecuencia, el endotelio se activa para comenzar un proceso angiogénico y reparar el daño. En el individuo sano, la red capilar se regenera con normalidad. En el individuo HHT2, la haploinsuficiencia de ALK1 impide la remodelado vascular en respuesta a daño vascular (mediada por KLF6) o a hipoxia (mediada por HIF-1 $\alpha$ ) y en su lugar ocurre es una angiogénesis aberrante, donde los nuevos vasos generados se engrosan debido a la debilidad de la pared vascular, formando dilataciones, conexiones arteriovenosas directas, y pérdida de la red vascular. Estas malformaciones arteriovenosas producen las telangiectasias características de la enfermedad.

**CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES

### **Objetivo 1 - Caracterización de la secuencia promotora del gen *ACVRL1* humano, y estudio de los mecanismos basales que regulan su transcripción.**

- 1.1. El gen *ACVRL1* carece de cajas generales de transcripción, tiene múltiples inicios de transcripción y contiene regiones exónicas que se transcriben pero no se traducen.
- 1.2. La transcripción del gen *ACVRL1* está dirigida por el factor Sp1. Sp1 se une *in vivo* al promotor de *ACVRL1* en células endoteliales y posee, al menos, dos sitios funcionales situados en -84/-78 y -67/-62. En ausencia de Sp1, el promotor de *ACVRL1* no tiene actividad transcripcional.
- 1.3. El promotor de *ACVRL1* posee dos islas CpG en las posiciones -408/-239 y -177/+28. El estado de metilación de dichas islas modula la unión de Sp1 al promotor de *ACVRL1* y por lo tanto la expresión de ALK1.

### **Objetivo 2 - Estudio de la regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al daño endotelial.**

- 2.1. ALK1 aumenta su expresión en endotelio en respuesta al daño endotelial, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta respuesta acontece tras la translocación de KLF6 al núcleo.
- 2.2. La expresión de ALK1 se regula a la baja ante una menor expresión de KLF6. KLF6 interacciona con el promotor de *ACVRL1* en células endoteliales, y su unión al promotor es mayor tras el daño endotelial.
- 2.3. KLF6 transactiva el promotor de *ACVRL1* mediante un mecanismo de cooperación sinérgica con Sp1, y favorece la proliferación y migración de las células endoteliales.

### **Objetivo 3 - Estudio de la regulación transcripcional de ALK1 en respuesta al estímulo hipóxico en el endotelio.**

- 3.1. ALK1 aumenta su expresión en endotelio en situación de hipoxia y este aumento se ve reflejado en una activación de la ruta ALK1/Smad1/5.
- 3.2. El aumento de la expresión de ALK1 en hipoxia se debe a la regulación transcripcional mediada por el factor HIF-1 $\alpha$ .
- 3.3. HIF-1 $\alpha$  regula transcripcionalmente a *ACVRL1* mediante la unión a un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en el sitio -288/-27.



## BIBLIOGRAFÍA

**Abdalla, S. A. y Letarte, M.** (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* **43**, 97-110.

**Abdalla, S. A., Pece-Barbara, N., Vera, S., Tapia, E., Paez, E., Bernabeu, C. y Letarte, M.** (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* **9**, 1227-37.

**Adams, R. H. y Alitalo, K.** (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464-78.

**Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C. y Lawley, T. J.** (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* **99**, 683-90.

**Albiñana, V., Bernabeu-Herrero, M. E., Zarrabeitia, R., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2010). Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* **103**, 525-34.

**Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A. et al.** (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* **217**, 42-53.

**Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schattman, G. y Isner, J. M.** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7.

**Aso, T., Serizawa, H., Conaway, R. C. y Conaway, J. W.** (1994). A TATA sequence-dependent transcriptional repressor activity associated with mammalian transcription factor IIA. *Embo J* **13**, 435-45.

**Atkins, G. B. y Jain, M. K.** (2007). Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res* **100**, 1686-95.

**Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massague, J. y Wrana, J. L.** (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* **75**, 671-80.

**Bayrak-Toydemir, P., McDonald, J., Akarsu, N., Toydemir, R. M., Calderon, F., Tuncali, T., Tang, W., Miller, F. y Mao, R.** (2006). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A* **140**, 2155-62.

**Beger, B., Robertson, K., Evans, A., Grant, A. y Berg, J.** (2006). Expression of endoglin and the activin receptor-like kinase 1 in skin suggests a role for these receptors in normal skin function and skin tumorigenesis. *Br J Dermatol* **154**, 379-82.



**Beleslin-Cokic, B. B., Cokic, V. P., Yu, X., Weksler, B. B., Schechter, A. N. y Noguchi, C. T.** (2004). Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* **104**, 2073-80.

**Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H. y Miller, A.** (2002). Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res* **90**, 784-91.

**Berg, J. N., Gallione, C. J., Stenzel, T. T., Johnson, D. W., Allen, W. P., Schwartz, C. E., Jackson, C. E., Porteous, M. E. y Marchuk, D. A.** (1997). The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* **61**, 60-7.

**Bergh, N., Ulfhammer, E., Glise, K., Jern, S. y Karlsson, L.** (2009). Influence of TNF-alpha and biomechanical stress on endothelial anti- and prothrombotic genes. *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 314-8.

**Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D. y Pouyssegur, J.** (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J* **22**, 4082-90.

**Bianchi, L., Tacchini, L. y Cairo, G.** (1999). HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res* **27**, 4223-7.

**Black, A. R., Black, J. D. y Azizkhan-Clifford, J.** (2001). Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* **188**, 143-60.

**Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C. P. y Bernabeu, C.** (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* **204**, 574-84.

**Boehm, J. R., Kutz, S. M., Sage, E. H., Staiano-Coico, L. y Higgins, P. J.** (1999). Growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression during epithelial cell stimulation by serum and transforming growth factor-beta1. *J Cell Physiol* **181**, 96-106.

**Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Rius, C., Corbi, A. y Bernabeu, C.** (2001). Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* **276**, 34486-94.

**Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M. P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C. P. et al.** (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* **100**, 4001-10.

**Bourdeau, A., Dumont, D. J. y Letarte, M.** (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **104**, 1343-51.

**Brahimi-Horn, C., Mazure, N. y Pouyssegur, J.** (2005). Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* **17**, 1-9.

**Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. y Cedar, H.** (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**, 435-8.

**Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. y Tjian, R.** (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**, 47-52.

**Bruick, R. K.** (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9082-7.

**Bruick, R. K. y McKnight, S. L.** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-40.

**Brummelkamp, T. R., Bernards, R. y Agami, R.** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3.

**Butta, N., Larrucea, S., Alonso, S., Rodriguez, R. B., Arias-Salgado, E. G., Ayuso, M. S., Gonzalez-Manchon, C. y Parrilla, R.** (2006). Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter. *BMC Mol Biol* **7**, 17.

**Cao, Y. X., Jean, J. C. y Williams, M. C.** (2000). Cytosine methylation of an Sp1 site contributes to organ-specific and cell-specific regulation of expression of the lung epithelial gene t1 $\alpha$ . *Biochem J* **350 Pt 3**, 883-90.

**Carlson, C. M., Endrizzi, B. T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M. A., Walsh, E. R., Wani, M. A., Lingrel, J. B., Hogquist, K. A. y Jameson, S. C.** (2006). Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* **442**, 299-302.

**Carmeliet, P.** (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-6.

**Carmeliet, P. y Baes, M.** (2008). Metabolism and therapeutic angiogenesis. *N Engl J Med* **358**, 2511-2.

**Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H. y Poellinger, L.** (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* **20**, 402-15.

**Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. y Werner, T.** (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933-42.

**Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. y Maity, A.** (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* **276**, 9519-25.

**Clark, S. J., Harrison, J. y Molloy, P. L.** (1997). Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* **195**, 67-71.

**Cleaver, O. y Melton, D. A.** (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med* **9**, 661-8.

**Cole, S. G., Begbie, M. E., Wallace, G. M. y Shovlin, C. L.** (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* **42**, 577-82.

**Cormier-Regard, S., Nguyen, S. V. y Claycomb, W. C.** (1998). Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* **273**, 17787-92.

**Courey, A. J., Holtzman, D. A., Jackson, S. P. y Tjian, R.** (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* **59**, 827-36.

**Courey, A. J. y Tjian, R.** (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**, 887-98.

**Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. y Brenner, S. E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188-90.

**Dang, D. T., Pevsner, J. y Yang, V. W.** (2000). The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1103-21.

**Das, A., Fernandez-Zapico, M. E., Cao, S., Yao, J., Fiorucci, S., Hebbel, R. P., Urrutia, R. y Shah, V. H.** (2006). Disruption of an SP2/KLF6 repression complex by SHP is required for farnesoid X receptor-induced endothelial cell migration. *J Biol Chem* **281**, 39105-13.

**David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J. y Bailly, S.** (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953-61.

**Derynck, R. y Zhang, Y. E.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.

**Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E. y Seiser, C.** (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* **19**, 5504-11.

**Dynan, W. S. y Tjian, R.** (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**, 79-87.

**Eckhart, A. D., Yang, N., Xin, X. y Faber, J. E.** (1997). Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9487-92.

**Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A. et al.** (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43-54.

**Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G. y Semenza, G. L.** (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* **59**, 3915-8.

**Feng, X. H. y Derynck, R.** (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-93.

**Feng, X. H., Lin, X. y Derynck, R.** (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* **19**, 5178-93.

**Fernandez-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellon, T., Letarte, M. y Bernabeu, C.** (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* **64**, 204-7.

**Fernandez, L. A., Garrido-Martin, E. M., Sanz-Rodriguez, F., Ramirez, J. R., Morales-Angulo, C., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2007). Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): regulation of ALK-1/endoglin pathway in endothelial cells. *Thromb Haemost* **97**, 254-62.

**Fernandez, L. A., Sanz-Rodriguez, F., Blanco, F. J., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2006). Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* **4**, 66-78.

**Fernandez, L. A., Sanz-Rodriguez, F., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Hebbel, R. P., Nguyen, J., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2005). Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* **68**, 235-48.

**Ferrara, N. y Kerbel, R. S.** (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-74.

**Finsson, K. W., Parker, W. L., ten Dijke, P., Thorikay, M. y Philip, A.** (2008). ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* **23**, 896-906.

**Folkman, J. y Klagsbrun, M.** (1987). Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-7.

**Fuchizaki, U., Miyamori, H., Kitagawa, S., Kaneko, S. y Kobayashi, K.** (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *Lancet* **362**, 1490-4.

**Gallione, C., Aylsworth, A. S., Beis, J., Berk, T., Bernhardt, B., Clark, R. D., Clericuzio, C., Danesino, C., Drautz, J., Fahl, J. et al.** (2010). Overlapping spectra of SMAD4 mutations in juvenile polyposis (JP) and JP-HHT syndrome. *Am J Med Genet A* **152A**, 333-9.

**Gallione, C. J., Repetto, G. M., Legius, E., Rustgi, A. K., Schelley, S. L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, E., Westermann, C. J. y Marchuk, D. A.** (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* **363**, 852-9.

**Gamble, M. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Freedman, L. P. y Fisher, R. P.** (2005). The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates. *Mol Cell Biol* **25**, 797-807.

**Garrett-Sinha, L. A., Eberspaecher, H., Seldin, M. F. y de Crombrughe, B.** (1996). A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* **271**, 31384-90.

**Garrido-Martin, E. M., Blanco, F. J., Fernandez, L. A., Langa, C., Vary, C. P., Lee, U. E., Friedman, S. L., Botella, L. M. y Bernabeu, C.** (2010). Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol* **11**, 51.

**Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z. H. y Tjian, R.** (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 192-6.

**Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. y Garcia-Cardena, G.** (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 230-9; discussion 239-40.

**Goldberg, M. A., Dunning, S. P. y Bunn, H. F.** (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242**, 1412-5.

**Goligorsky, M. S.** (2000). Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Int* **58**, 1360-76.

**Gordon, K. J. y Blobel, G. C.** (2008). Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 197-228.

**Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. y ten Dijke, P.** (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J* **21**, 1743-53.

**Goumans, M. J., Lebrin, F. y Valdimarsdottir, G.** (2003). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-beta receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 301-7.

**Goumans, M. J., Liu, Z. y ten Dijke, P.** (2009). TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* **19**, 116-27.

**Goumans, M. J. y Mummery, C.** (2000). Functional analysis of the TGF-beta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* **44**, 253-65.

**Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. y ten Dijke, P.** (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J* **21**, 1743-53.

**Govani, F. S. y Shovlin, C. L.** (2009). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet.*

**Graven, K. K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J. S. y Farber, H. W.** (1999). Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 208-18.

**Gresele, P., Momi, S. y Migliacci, R.** (2010). Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost* **103**, 56-61.

**Grosfeld, A., Andre, J., Hauguel-De Mouzon, S., Berra, E., Pouyssegur, J. y Guerre-Millo, M.** (2002). Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J Biol Chem* **277**, 42953-7.

**Guttmacher, A. E., Marchuk, D. A. y White, R. I., Jr.** (1995). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* **333**, 918-24.

**Hack, C. E. y Zeerleder, S.** (2001). The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* **29**, S21-7.

**Hagen, G., Muller, S., Beato, M. y Suske, G.** (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* **20**, 5519-25.

**Hagen, G., Muller, S., Beato, M. y Suske, G.** (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* **13**, 3843-51.

**Hamik, A., Lin, Z., Kumar, A., Balcells, M., Sinha, S., Katz, J., Feinberg, M. W., Gerzsten, R. E., Edelman, E. R. y Jain, M. K.** (2007). Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem* **282**, 13769-79.

**Hanes, F.** (1909). Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Johns Hopkins Hospital Bulletin* **20**, 63-73.

**Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y. y Imura, N.** (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 808-13.

**Harrison, R. E., Flanagan, J. A., Sankelo, M., Abdalla, S. A., Rowell, J., Machado, R. D., Elliott, C. G., Robbins, I. M., Olschewski, H., McLaughlin, V. et al.** (2003). Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* **40**, 865-71.

**Heldin, C. H., Miyazono, K. y ten Dijke, P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-71.

**Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K. y Fujii-Kuriyama, Y.** (1996). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* **16**, 1706-13.

**Hu, J., Discher, D. J., Bishopric, N. H. y Webster, K. A.** (1998). Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 894-9.

**Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M. y Lee, F. S.** (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* **277**, 39792-800.

**Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M. y Bunn, H. F.** (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem* **271**, 32253-9.

**Indraccolo, S., Habeler, W., Tisato, V., Stievano, L., Piovan, E., Tosello, V., Esposito, G., Wagner, R., Uberla, K., Chieco-Bianchi, L. et al.** (2002). Gene transfer in ovarian cancer cells: a comparison between retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Res* **62**, 6099-107.

**Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. y Kaelin, W. G., Jr.** (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* **292**, 464-8.

**Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J. et al.** (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-72.

**Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S. J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A. et al.** (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* **13**, 189-95.

**Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Luciw, P. A. y Tjian, R.** (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232**, 755-9.

**Jones, N., Iljin, K., Dumont, D. J. y Alitalo, K.** (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 257-67.

**Jonson, T., Albrechtsson, E., Axelson, J., Heidenblad, M., Gorunova, L., Johansson, B. y Hoglund, M.** (2001). Altered expression of TGFB receptors and mitogenic effects of TGFB in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* **19**, 71-81.

**Kaczynski, J., Cook, T. y Urrutia, R.** (2003). Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* **4**, 206.

**Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A. y Emerson, B. M.** (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev* **14**, 2441-51.



**Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. y Tjian, R.** (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-90.

**Kadonaga, J. T., Courey, A. J., Ladika, J. y Tjian, R.** (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242**, 1566-70.

**Kadonaga, J. T. y Tjian, R.** (1986). Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5889-93.

**Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. y Poellinger, L.** (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5667-72.

**Ke, Q. y Costa, M.** (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**, 1469-80.

**Kietzmann, T., Roth, U. y Jungermann, K.** (1999). Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**, 4177-85.

**Kingsley, C. y Winoto, A.** (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* **12**, 4251-61.

**Klagsbrun, M. y D'Amore, P. A.** (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* **53**, 217-39.

**Kojima, S., Hayashi, S., Shimokado, K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M. P. y Friedman, S. L.** (2000). Transcriptional activation of urokinase by the Kruppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF- $\beta$ 1 in vascular endothelial cells. *Blood* **95**, 1309-16.

**Konig, H. G., Kogel, D., Rami, A. y Prehn, J. H.** (2005). TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling. *J Cell Biol* **168**, 1077-86.

**Korchynskyi, O. y ten Dijke, P.** (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* **277**, 4883-91.

**Koritschoner, N. P., Bocco, J. L., Panzetta-Dutari, G. M., Dumur, C. I., Flury, A. y Patrito, L. C.** (1997). A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem* **272**, 9573-80.

**Koutsodontis, G., Moustakas, A. y Kardassis, D.** (2002). The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs, and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter. *Biochemistry* **41**, 12771-84.

**Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P. et al.** (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **63**, 1138-43.



**Kuo, C. T., Veselits, M. L., Barton, K. P., Lu, M. M., Clendenin, C. y Leiden, J. M.** (1997). The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev* **11**, 2996-3006.

**Lalazar, A., Wong, L., Yamasaki, G. y Friedman, S. L.** (1997). Early genes induced in hepatic stellate cells during wound healing. *Gene* **195**, 235-43.

**Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J. J. y Bailly, S.** (2002). Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* **100**, 4495-501.

**Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L. y Bruick, R. K.** (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **16**, 1466-71.

**Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. y Whitelaw, M. L.** (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**, 858-61.

**Lania, L., Majello, B. y De Luca, P.** (1997). Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1313-23.

**Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R. et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-8.

**Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H. M. y ten Dijke, P.** (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J* **23**, 4018-28.

**LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G. A. et al.** (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**, 877-84.

**Lee, N. Y., Haney, J. C., Sogani, J. y Blobe, G. C.** (2009). Casein kinase 2beta as a novel enhancer of activin-like receptor-1 signaling. *Faseb J* **23**, 3712-21.

**Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L. y Choi, A. M.** (1997). Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* **272**, 5375-81.

**Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. y Goldberg, M. A.** (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**, 13333-40.

**Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B. y Wendel, D. P.** (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**, 1534-7.

**Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J. M., Friedman, S. L. et al.** (2005). Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem* **280**, 26941-52.

**Li, L., He, S., Sun, J. M. y Davie, J. R.** (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* **82**, 460-71.

**Li, L., Zhao, X. Y. y Wang, B. E.** (2008). Down-regulation of transforming growth factor beta 1/activin receptor-like kinase 1 pathway gene expression by herbal compound 861 is related to deactivation of LX-2 cells. *World J Gastroenterol* **14**, 2894-9.

**Li, X., Yonenaga, Y. y Seki, T.** (2009). Shortened ALK1 regulatory fragment maintains a specific activity in arteries feeding ischemic tissues. *Gene Ther* **16**, 1034-41.

**Lieb, M. E., Menzies, K., Moschella, M. C., Ni, R. y Taubman, M. B.** (2002). Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol* **80**, 421-6.

**Lok, C. N. y Ponka, P.** (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* **274**, 24147-52.

**Lux, A., Attisano, L. y Marchuk, D. A.** (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* **274**, 9984-92.

**Lux, A., Salway, F., Dressman, H. K., Kroner-Lux, G., Hafner, M., Day, P. J., Marchuk, D. A. y Garland, J.** (2006). ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc Disord* **6**, 13.

**Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J. y Bird, A. P.** (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* **8**, 2282-92.

**Mahmoud, M., Borthwick, G. M., Hislop, A. A. y Arthur, H. M.** (2009). Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH. *Lab Invest* **89**, 15-25.

**Mallet, C., Vittet, D., Feige, J. J. y Bailly, S.** (2006). TGFbeta1 induces vasculogenesis and inhibits angiogenic sprouting in an embryonic stem cell differentiation model: respective contribution of ALK1 and ALK5. *Stem Cells* **24**, 2420-7.

**Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G. y Semenza, G. L.** (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**, 659-69.

**Mancini, M. L., Verdi, J. M., Conley, B. A., Nicola, T., Spicer, D. B., Oxburgh, L. H. y Vary, C. P.** (2007). Endoglin is required for myogenic differentiation potential of neural crest stem cells. *Dev Biol* **308**, 520-33.

**Massague, J., Cheifetz, S., Boyd, F. T. y Andres, J. L.** (1990). TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci* **593**, 59-72.

**Massague, J., Seoane, J. y Wotton, D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-810.

**Masson, N. y Ratcliffe, P. J.** (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci* **116**, 3041-9.

**Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. y Ratcliffe, P. J.** (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J* **20**, 5197-206.

**Mathupala, S. P., Rempel, A. y Pedersen, P. L.** (2001). Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* **276**, 43407-12.

**Matsumoto, N., Kubo, A., Liu, H., Akita, K., Laub, F., Ramirez, F., Keller, G. y Friedman, S. L.** (2006). Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood* **107**, 1357-65.

**Matsushita, K., Hagihara, M. y Sugiura, Y.** (1998). Participation of oligomerization through C-terminal D domain region of Sp1 in DNA binding. *Biol Pharm Bull* **21**, 1094-7.

**Maynard, M. A., Evans, A. J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A. y Ohh, M.** (2005). Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *Faseb J* **19**, 1396-406.

**Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C. y Pouyssegur, J.** (2003). Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. *Curr Pharm Des* **9**, 531-41.

**McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J. et al.** (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* **8**, 345-51.

**McCormick, S. M., Eskin, S. G., McIntire, L. V., Teng, C. L., Lu, C. M., Russell, C. G. y Chittur, K. K.** (2001). DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8955-60.

**McDonald, M. T., Papenberg, K. A., Ghosh, S., Glatfelter, A. A., Biesecker, B. B., Helmbold, E. A., Markel, D. S., Zolotor, A., McKinnon, W. C., Vanderstoep, J. L. et al.** (1994). A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* **6**, 197-204.

**Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W. y Varesio, L.** (1995). A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* **182**, 1683-93.

**Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W. et al.** (2003). Intracellular

localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* **116**, 1319-26.

**Miller, I. J. y Bieker, J. J.** (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 2776-86.

**Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V. y Caro, J.** (2002). Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* **277**, 6183-7.

**Mo, J., Fang, S. J., Chen, W. y Blobe, G. C.** (2002). Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXRbeta. *J Biol Chem* **277**, 50788-94.

**Mole, D. R., Blancher, C., Copley, R. R., Pollard, P. J., Gleadle, J. M., Ragoussis, J. y Ratcliffe, P. J.** (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* **284**, 16767-75.

**Moustakas, A. y Heldin, C. H.** (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-84.

**Moustakas, A. y Kardassis, D.** (1998). Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6733-8.

**Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B. y Fox, P. L.** (2000). Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* **275**, 21048-54.

**Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O. y Darst, S. A.** (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**, 1285-90.

**Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K. y Imaizumi, T.** (2000). Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **105**, 1527-36.

**Nakayama, K. y Ronai, Z.** (2004). Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* **3**, 1345-7.

**Nguyen, S. V. y Claycomb, W. C.** (1999). Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 382-6.

**O'Rourke, J. F., Pugh, C. W., Bartlett, S. M. y Ratcliffe, P. J.** (1996). Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur J Biochem* **241**, 403-10.

**Oehme, F., Ellinghaus, P., Kolkhof, P., Smith, T. J., Ramakrishnan, S., Hutter, J., Schramm, M. y Flamme, I.** (2002). Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 343-9.

**Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S. et al.** (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2626-31.

**Opitz, O. G. y Rustgi, A. K.** (2000). Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene. *Cancer Res* **60**, 2825-30.

**Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H. y Miyazono, K.** (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* **193**, 299-318.

**Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D. y Moustakas, A.** (2000). Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **275**, 29244-56.

**Pardanaud, L., Yassine, F. y Dieterlen-Lievre, F.** (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* **105**, 473-85.

**Park, S. O., Wankhede, M., Lee, Y. J., Choi, E. J., Fliess, N., Choe, S. W., Oh, S. H., Walter, G., Raizada, M. K., Sorg, B. S. et al.** (2009). Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **119**, 3487-96.

**Pascal, E. y Tjian, R.** (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* **5**, 1646-56.

**Patan, S., Munn, L. L. y Jain, R. K.** (1996). Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* **51**, 260-72.

**Pepper, M. S.** (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 21-43.

**Philipsen, S. y Suske, G.** (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* **27**, 2991-3000.

**Pichuantes, S., Vera, S., Bourdeau, A., Pece, N., Kumar, S., Wayner, E. A. y Letarte, M.** (1997). Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* **50**, 265-76.

**Piek, E., Heldin, C. H. y Ten Dijke, P.** (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* **13**, 2105-24.

**Poole, T. J. y Coffin, J. D.** (1989). Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* **251**, 224-31.

**Preiss, A., Rosenberg, U. B., Kienlin, A., Seifert, E. y Jackle, H.** (1985). Molecular genetics of Kruppel, a gene required for segmentation of the Drosophila embryo. *Nature* **313**, 27-32.

**Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M. y Ratcliffe, P. J.** (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **272**, 11205-14.

**Raab, U., Velasco, B., Lastres, P., Letamendia, A., Cales, C., Langa, C., Tapia, E., Lopez-Bote, J. P., Paez, E. y Bernabeu, C.** (1999). Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem J* **339** ( Pt 3), 579-88.

**Ratzliff, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S. y Friedman, S. L.** (1998). Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9500-5.

**Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. y Hankinson, O.** (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* **256**, 1193-5.

**Richard, D. E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. y Pouyssegur, J.** (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* **274**, 32631-7.

**Richard, D. E., Berra, E. y Pouyssegur, J.** (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**, 26765-71.

**Risau, W.** (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-4.

**Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H. G., Sasse, J., Eklom, P., Kemler, R. y Doetschman, T.** (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**, 471-8.

**Roberts, A. B. y Sporn, M. B.** (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* **8**, 1-9.

**Roelen, B. A., van Rooijen, M. A. y Mummery, C. L.** (1997). Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn* **209**, 418-30.

**Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. y Wenger, R. H.** (1997). Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* **272**, 20055-62.

**Roque, M., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Zhang, W. X., Taubman, M. B. y Reis, E. D.** (2000). Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 335-42.

**Ruas, J. L., Poellinger, L. y Pereira, T.** (2002). Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem* **277**, 38723-30.

**Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., Garre, M., Liebner, S., Letarte, M., ten Dijke, P. et al.** (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *Embo J* **27**, 993-1004.

**Sabin, F. R.** (2002). Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 5-7.

**Saffer, J. D., Jackson, S. P. y Annarella, M. B.** (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* **11**, 2189-99.

**Saffer, J. D., Jackson, S. P. y Thurston, S. J.** (1990). SV40 stimulates expression of the transacting factor Sp1 at the mRNA level. *Genes Dev* **4**, 659-66.

**Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L. y Bernabeu, C.** (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* **276**, 38527-35.

**Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Langa, C. y Bernabeu, C.** (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **277**, 43799-808.

**Sanchez-Elsner, T., Ramirez, J. R., Sanz-Rodriguez, F., Varela, E., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2004). A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol* **336**, 9-24.

**Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C. P., Lopez-Novoa, J. M., Attisano, L. y Bernabeu, C.** (2007). Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**, 456-68.

**Sanz-Rodriguez, F., Fernandez, L. A., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Ramirez, J. R., Coto, E., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2004). Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem* **50**, 2003-11.



**Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., Lowik, C. W. y ten Dijke, P.** (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* **120**, 964-72.

**Scheid, A., Wenger, R. H., Schaffer, L., Camenisch, I., Distler, O., Ferenc, A., Cristina, H., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Wagner, K. F. et al.** (2002). Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3. *Faseb J* **16**, 411-3.

**Schmierer, B. y Hill, C. S.** (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 970-82.

**Schofield, C. J. y Zhang, Z.** (1999). Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 722-31.

**Seki, T., Hong, K. H. y Oh, S. P.** (2006). Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* **86**, 116-29.

**Seki, T., Hong, K. H., Yun, J., Kim, S. J. y Oh, S. P.** (2004). Isolation of a regulatory region of activin receptor-like kinase 1 gene sufficient for arterial endothelium-specific expression. *Circ Res* **94**, e72-7.

**Seki, T., Yun, J. y Oh, S. P.** (2003). Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res* **93**, 682-9.

**Semenza, G. L.** (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 588-94.

**Semenza, G. L.** (1999). Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 551-78.

**Semenza, G.** (2010). Oxygen homeostasis. En: Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. Volumen 2. Capítulo 3. págs. 336-391. DOI: 10.1002/wsbm.69

**Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. y Giallongo, A.** (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 32529-37.

**Semenza, G. L., Neufelt, M. K., Chi, S. M. y Antonarakis, S. E.** (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5680-4.

**Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. y Wang, G. L.** (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **269**, 23757-63.



**Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A. y Massague, J.** (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**, 211-23.

**Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R. et al.** (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* **92**, 362-7.

**Shi, Y. y Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.

**Shields, J. M., Christy, R. J. y Yang, V. W.** (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* **271**, 20009-17.

**Shovlin, C. L., Guttmacher, A. E., Buscarini, E., Faughnan, M. E., Hyland, R. H., Westermann, C. J., Kjeldsen, A. D. y Plauchu, H.** (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* **91**, 66-7.

**Shovlin, C. L., Hughes, J. M., Tuddenham, E. G., Temperley, I., Perembelon, Y. F., Scott, J., Seidman, C. E. y Seidman, J. G.** (1994). A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet* **6**, 205-9. Shovlin y Oh, 2010.

**Shovlin, C. L., y Oh, S. P.** (2010). Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. En: McCormack, F. X., Panos, R. J., y Trapnell, B. C., editores. Molecular Basis of Pulmonary Disease. Insights for rare lung disorders. Capítulo 7. Primera edición. New York. Humana Press. págs. 167-188. DOI: 10.1007/978-1-59745-384-4.

**Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B. Z. y Cedar, H.** (1999). DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* **22**, 203-6.

**Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Li, D. Y. y Urness, L. D.** (2003). Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGFbeta coreceptor. *Dev Biol* **261**, 235-50.

**Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H. y Caro, J.** (1999). Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 557-61.

**Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G. et al.** (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6062-7.

**Suske, G.** (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**, 291-300.

**Suske, G., Bruford, E. y Philipsen, S.** (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* **85**, 551-6.

**Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R. y Horikoshi, M.** (2000). Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells* **5**, 29-41.

**Suzuki, T., Matsumura, T. y Nagai, R.** (2005). Transcriptional regulation at the chromatin level in the cardiovascular system through protein-protein interactions and chemical modifications. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 125-9.

**Suzuki, T., Yamamoto, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., Yazaki, Y. y Horikoshi, M.** (1998). Isolation and initial characterization of GBF, a novel DNA-binding zinc finger protein that binds to the GC-rich binding sites of the HIV-1 promoter. *J Biochem* **124**, 389-95.

**Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K. y Watabe, T.** (2010). BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci* **123**, 1684-92.

**Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T. y Miura, T.** (2000). Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase  $\alpha$  (I) in cultured cells. *J Biol Chem* **275**, 14139-46.

**Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. y Fujii-Kuriyama, Y.** (1998). Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 $\alpha$ , HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 789-94.

**Tan, N. Y. y Khachigian, L. M.** (2009). Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* **29**, 2483-8.

**ten Dijke, P. y Arthur, H. M.** (2007). Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 857-69.

**ten Dijke, P., Franzen, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Heldin, C. H. y Miyazono, K.** (1994). Serine/threonine kinase receptors. *Prog Growth Factor Res* **5**, 55-72.

**ten Dijke, P., Goumans, M. J. y Pardali, E.** (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**, 79-89.

**ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C. H. y Miyazono, K.** (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* **8**, 2879-87.

**Tournay, O. y Benezra, R.** (1996). Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* **16**, 2418-30.

**Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. y Wrana, J. L.** (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF $\beta$  receptor. *Cell* **95**, 779-91.

**Turner, J. y Crossley, M.** (1999). Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* **24**, 236-40.

**Ungefroren, H., Schniewind, B., Groth, S., Chen, W. B., Muerkoster, S. S., Kalthoff, H. y Fandrich, F.** (2007). Antitumor activity of ALK1 in pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer* **120**, 1641-51.

**Urness, L. D., Sorensen, L. K. y Li, D. Y.** (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* **26**, 328-31.

**Valdimarsdottir, G., Goumans, M. J., Itoh, F., Itoh, S., Heldin, C. H. y ten Dijke, P.** (2006). Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol* **7**, 16.

**Velasco, S., Alvarez-Munoz, P., Pericacho, M., Dijke, P. T., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M. y Rodriguez-Barbero, A.** (2008). L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* **121**, 913-9.

**Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. y Semenza, G. L.** (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-4.

**Wani, M. A., Means, R. T., Jr. y Lingrel, J. B.** (1998). Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res* **7**, 229-38.

**Wani, M. A., Wert, S. E. y Lingrel, J. B.** (1999). Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J Biol Chem* **274**, 21180-5.

**Wautier, J. L. y Schmidt, A. M.** (2004). Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* **95**, 233-8.

**Werb, Z.** (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**, 439-42.

**Wierstra, I.** (2008). Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* **372**, 1-13.

**Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G. D., Turley, H., Talks, K. L., Maxwell, P. H. et al.** (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* **60**, 7075-83.

**Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. y Holash, J.** (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-8.

**Yet, S. F., McA'Nulty, M. M., Folta, S. C., Yen, H. W., Yoshizumi, M., Hsieh, C. M., Layne, M. D., Chin, M. T., Wang, H., Perrella, M. A. et al.** (1998). Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* **273**, 1026-31.

**Yu, B., Datta, P. K. y Bagchi, S.** (2003). Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res* **31**, 5368-76.

**Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T. y Millhorn, D. E.** (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* **278**, 15911-6.

**Zawel, L., Dai, J. L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Kern, S. E.** (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* **1**, 611-7.

**Zhang, W., Ou, J., Inagaki, Y., Greenwel, P. y Ramirez, F.** (2000). Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem* **275**, 39237-45.

**Zhang, Y. E.** (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**, 128-39.

**ANEXOS**

El trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. **Garrido-Martin EM**, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee U, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C. "Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1". *BMC Mol Biol*. 2010. Jun 29;11(1):51. PMID: 20587022
2. **Garrido-Martin EM**, Roquè M, Tarocchi M, Lee UE, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C. "Krüppel-like factor 6 promotes endothelial function through Sp1 activation of the Activin Receptor-Like Kinase 1 (ALK1) upon vascular injury". *Enviado a Cardiovascular Research*.
3. **Garrido-Martin EM**, Botella LM, Bernabeu C. "Activin Receptor-Like Kinase 1 (ALK1) role in angiogenic process after hypoxic stimulus is mediated by HIF-1 $\alpha$  transcriptional regulation". *Manuscrito en preparación*.

Además, durante la realización de esta Tesis Doctoral se ha colaborado en las siguientes publicaciones:

4. Santibañez JF, Pérez-Gómez E, Fernández-L A, **Garrido-Martin EM**, Carnero A, Malumbres M, Vary CP, Quintanilla M, Bernabéu C. "The TGF-beta co-receptor endoglin modulates the expression and transforming potential of H-Ras". *Carcinogenesis*. 2010. *In press*.
5. Bernabéu C, Blanco FJ, Langa C, **Garrido-Martin EM**, Botella LM. "Involvement of the TGF- $\beta$  superfamily signalling pathway in hereditary haemorrhagic telangiectasia". *J Appl Biomed*. 2010. 8:169–177.
6. Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Komi Y, Fernandez-L A, Varela E, **Garrido-Martin EM**, Narla G, Friedman SL, Kojima S. "TGF-beta regulates the expression of transcription factor KLF6 and its splice variants and promotes co-operative transactivation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction". *Biochem J*. 2009. 419:485-495. PMID: 19076057
7. Fontalba A, Fernandez-L A, García-Alegría E, Albiñana V, **Garrido-Martin EM**, Blanco FJ, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Bernabeu-Herrero ME, Ojeda ML, Fernandez-Luna JL, Bernabeu C, Botella LM. "Mutation study of Spanish patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia". *BMC Med Genet*. 2008. Aug 1;9:75- PMID: 18673552.
8. Santibañez JF, Blanco FJ, **Garrido-Martin EM**, Sanz-Rodriguez F, del Pozo MA, Bernabeu C. "Caveolin-1 interacts and cooperates with the TGF- $\beta$  type I receptor ALK1 in endothelial cell caveolae". *Cardiovasc Res*. 2008. 77: 791-799. PMID: 18065769.
9. Fernandez-L A, **Garrido-Martin EM**, Sanz-Rodriguez F, Pericacho M, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM, Ramírez JR, Zarrabeitia R, Pérez-Molino A, Morales-Angulo C, Vega MA, Bernabéu C, Botella LM. "Gene Expression Fingerprinting for human Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT)". *Hum Mol Genet*. 2007. 16:1515-1533. PMID: 17420163.
10. Fernandez-L A, **Garrido-Martin EM**, Sanz-Rodriguez F, Ramírez JR, Morales-Angulo C, Zarrabeitia R, Pérez-Molino A, Bernabéu C, Botella LM. "Therapeutic Action of Tranexamic Acid on HHT Patients. Regulation of ALK-1/Endoglin Pathway in Endothelial Cells". *Thrombosis and Haemostasis*. 2007. 97:254-962. PMID: 17264955.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (*ACVRL1*) promoter and its regulation by Sp1

Eva M Garrido-Martin<sup>1</sup>, Francisco J Blanco<sup>1</sup>, Africa Fernandez-L<sup>1,2</sup>, Carmen Langa<sup>1</sup>, Calvin P Vary<sup>3</sup>, Ursula E Lee<sup>4</sup>, Scott L Friedman<sup>4</sup>, Luisa M Botella<sup>1</sup>, Carmelo Bernabeu<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Activin receptor-like kinase 1 (ALK1) is a Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) receptor type I, mainly expressed in endothelial cells that plays a pivotal role in vascular remodelling and angiogenesis. Mutations in the ALK1 gene (*ACVRL1*) give rise to Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia, a dominant autosomal vascular dysplasia caused by a haploinsufficiency mechanism. In spite of its patho-physiological relevance, little is known about the transcriptional regulation of *ACVRL1*. Here, we have studied the different origins of *ACVRL1* transcription, we have analyzed *in silico* its 5'-proximal promoter sequence and we have characterized the role of Sp1 in the transcriptional regulation of *ACVRL1*.

**Results:** We have performed a 5'Rapid Amplification of cDNA Ends (5'RACE) of *ACVRL1* transcripts, finding two new transcriptional origins, upstream of the one previously described, that give rise to a new exon undiscovered to date. The 5'-proximal promoter region of *ACVRL1* (-1,035/+210) was analyzed *in silico*, finding that it lacks TATA/CAAT boxes, but contains a remarkably high number of GC-rich Sp1 consensus sites. In cells lacking Sp1, *ACVRL1* promoter reporters did not present any significant transcriptional activity, whereas increasing concentrations of Sp1 triggered a dose-dependent stimulation of its transcription. Moreover, silencing Sp1 in HEK293T cells resulted in a marked decrease of *ACVRL1* transcriptional activity. Chromatin immunoprecipitation assays demonstrated multiple Sp1 binding sites along the proximal promoter region of *ACVRL1* in endothelial cells. Furthermore, demethylation of CpG islands, led to an increase in *ACVRL1* transcription, whereas *in vitro* hypermethylation resulted in the abolishment of Sp1-dependent transcriptional activation of *ACVRL1*.

**Conclusions:** Our results describe two new transcriptional start sites in *ACVRL1* gene, and indicate that Sp1 is a key regulator of *ACVRL1* transcription, providing new insights into the molecular mechanisms that contribute to the expression of *ACVRL1* gene. Moreover, our data show that the methylation status of CpG islands markedly modulates the Sp1 regulation of *ACVRL1* gene transcriptional activity.

## Background

ALK1 (Activin receptor-Like Kinase 1) is a transmembrane type I receptor of the Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily of ligands, mainly found in endothelial cells. Its expression has been reported not only in highly vascularized tissues including lung, placenta, and heart [1,2], but also at specific sites of

epithelial-mesenchymal interactions [3], and in other cell types such as monocytes [4], microglia [5], skin fibroblasts [6], stellate hepatic cells [7], chondrocytes [8], neural crest stem cells [9] and more recently myoblasts [10]. Nonetheless, most studies to date suggest that its major roles are related to the endothelial specific expression pattern. ALK1 is involved in angiogenesis [11,12], and there is growing evidence indicating that it plays a key function in the arterial/venous differentiation during embryonic vascular development [13,14]. It has been reported that ALK1 interacts with three ligands: with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, in complex with the receptor

\* Correspondence: bernabeu@cib.csic.es

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain